

# Einfluss von ionisierender Strahlung auf die Differenzierung und Interaktion der Progenitorzellen des Knochenmarks

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines *Doctor rerum naturalium*

genehmigte

Dissertation

von

Dipl.-Ing. Aljona Groo

aus Tschernaja-Kurja

1. Referent: Prof. Marco Durante

2. Referent: Prof. Gerhard Thiel

Tag der Einreichung: 26. September 2014

Tag der mündlichen Prüfung: 25. November 2014

Darmstadt 2018

D17



Für meine Eltern.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>v</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>ix</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>xi</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>xiii</b>
<b>Summary</b>	<b>xv</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Struktureller Aufbau des Knochens . . . . .	1
1.1.1 Knochenmetabolismus und Entwicklung der Knochenzellen . . . . .	4
1.2 Muskuloskelettale Erkrankungen . . . . .	7
1.2.1 Rheumatoide Arthritis . . . . .	7
1.3 Rolle der T-Zellen bei entzündlichen Knochenerkrankungen . . . . .	8
1.4 Rolle von Zytokinen in der Entwicklung von rheumatoider Arthritis . . . . .	9
1.5 Therapie muskuloskelettaler Erkrankungen . . . . .	12
1.5.1 Konventionelle Basistherapie mit Medikamenten . . . . .	12
1.5.2 Niedrig-Dosis-Strahlentherapie . . . . .	14
1.6 Physikalische Grundlagen ionisierender Strahlung . . . . .	16
1.6.1 Dosisdeposition dünn ionisierender Strahlung . . . . .	16
1.6.2 Dosisdeposition dicht ionisierender Strahlung . . . . .	17
1.7 Strahlenbiologische Veränderungen . . . . .	19
1.7.1 Zellzyklusänderungen . . . . .	19
1.7.2 Differenzierung . . . . .	19
1.7.3 Apoptose . . . . .	19
1.8 Problemstellung . . . . .	20
<b>2 Methoden</b>	<b>23</b>
2.1 Zellen und Kultivierungsbedingungen . . . . .	23
2.1.1 Isolierung humaner Lymphozyten aus peripheren Blut . . . . .	23
2.1.2 Anreicherung der CD4 <sup>+</sup> T-Zellen . . . . .	24
2.1.3 Differenzierung von Th17/Treg-Zellen aus CD4 <sup>+</sup> T-Zellen . . . . .	25

2.1.4	Differenzierung von Osteoklasten . . . . .	25
2.1.5	Isolierung humaner mesenchymaler Stammzellen aus Knochenmarkaspi- raten . . . . .	25
2.1.6	Differenzierung humaner Adipozyten aus MSCs . . . . .	26
2.1.7	Differenzierung humaner Chondrozyten aus MSCs . . . . .	26
2.1.8	Differenzierung humaner Osteoblasten aus MSCs . . . . .	26
2.2	Histologische und immunologische Färbetechniken . . . . .	27
2.2.1	Phänotypisierung isolierter humaner mesenchymaler Stammzellen . . .	27
2.2.2	Alcianblau Färbung der Chondrozyten . . . . .	27
2.2.3	Alizarin Red S Färbung von $\text{Ca}^{2+}$ - Einlagerungen in Osteoblasten . .	28
2.2.4	Nachweis der alkalischen Phosphatase (ALP) in Osteoblasten . . . . .	29
2.2.5	Oil Red O Färbung von Adipozyten . . . . .	30
2.2.6	TRAP und F-Aktin Färbung in Osteoklasten . . . . .	30
2.2.7	Toluidinblau Färbung . . . . .	31
2.2.8	Intrazelluläre Antikörperfärbung der Th17 und Treg Zellen . . . . .	32
2.2.9	Annexin V-Färbung zur Apoptose-Detektion . . . . .	32
2.3	Zellzyklusanalyse . . . . .	34
2.4	Protein-Nachweismethoden . . . . .	34
2.4.1	ELISA . . . . .	34
2.4.2	Fluoreszenz-basierter Bead Immunoassay . . . . .	35
2.4.3	Herstellung der Zelllysate . . . . .	36
2.4.4	Bestimmung der Proteinkonzentration . . . . .	36
2.4.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese . . . . .	36
2.4.6	Western Blot . . . . .	37
2.4.7	TRAP-Aktivitätsmessung . . . . .	37
2.5	Nachweis der Genexpression in humanen Osteoblasten mittels qRT-PCR . . .	37
2.5.1	RNA Isolierung . . . . .	37
2.5.2	cDNA Synthese . . . . .	38
2.5.3	Quantitative real-time PCR . . . . .	38
2.6	Patientenstudie RADON . . . . .	39
2.6.1	Design der Studie . . . . .	39
2.6.2	Patienten . . . . .	39
2.6.3	Radontherapie . . . . .	40
2.6.4	Klinische und diagnostische Untersuchungen . . . . .	40
2.7	Bestrahlung . . . . .	41
2.7.1	X-ray Bestrahlung . . . . .	41
2.7.2	Klonogenes Zellüberleben . . . . .	41
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>43</b>
3.1	Einfluss von Strahlung auf die Differenzierung humaner Osteoblasten . . . . .	43
3.1.1	Immunophänotypische Merkmale humaner mesenchymaler Stammzellen	43
3.1.2	Nachweis der multipotenten Eigenschaft von mesenchymalen Stammzellen	44
3.1.3	Proliferation und Zellzyklusverteilung von Osteoblasten . . . . .	45

3.1.4	Klonogenes Überleben humaner Osteoblasten . . . . .	46
3.1.5	Genexpression der Differenzierungsmarker in Osteoblasten . . . . .	46
3.1.6	Expression der alkalischen Phosphatase und $\text{Ca}^{2+}$ -Inkorporation in Osteoblasten . . . . .	48
3.1.7	Bestimmung von für den Knochenmetabolismus relevanten Zytokinen	49
3.2	Einfluss von Strahlung auf die Differenzierung humaner Osteoklasten . . . . .	51
3.2.1	Apoptose in Monozyten . . . . .	52
3.2.2	Differenzierung von Osteoklasten auf Plastik . . . . .	52
3.2.3	Differenzierung der Osteoklasten auf Knochen . . . . .	53
3.2.4	Proteinexpression humaner Osteoklasten nach Bestrahlung . . . . .	55
3.2.5	Strahleninduzierte Freisetzung der tartratresistenten sauren Phosphatase von Osteoklasten . . . . .	57
3.3	Einfluss von Strahlung auf die Differenzierung von Th17 und Treg Zellen . . .	57
3.3.1	Differenzierung und Proliferation von Treg und Th17 . . . . .	58
3.3.2	Differenzierung der Immunzellen unter entzündlichen Bedingungen . .	60
3.3.3	Bestimmung der Zytokinfreisetzung der differenzierten Zellen . . . . .	60
3.4	Untersuchungen zu der Patientenstudie RADON . . . . .	61
3.4.1	Verteilung Th17 und Treg Zellen im peripheren Blut der Patienten . .	64
3.4.2	Zytokinbestimmungen im peripheren Blut . . . . .	65
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>67</b>
4.1	Einfluss von Strahlung auf das Überleben und die Differenzierung von primären Osteoblasten . . . . .	67
4.2	Differenzierung und Aktivität der Osteoklasten nach Bestrahlung . . . . .	74
4.3	Strahleninduzierte Differenzierung von Tregs und Th17 Immunzellen . . . . .	77
4.4	Messungen der für den Knochenmetabolismus relevanten Zytokine im Patientenserum . . . . .	79
<b>5</b>	<b>Fazit</b>	<b>81</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>85</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>93</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>115</b>
	<b>Curriculum Vitae</b>	<b>117</b>
	<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b>	<b>119</b>





# Abbildungsverzeichnis

1.1	Bestandteile eines Langknochens. . . . .	2
1.2	Kompakter Knochen . . . . .	3
1.3	Differenzierung von Osteoblasten. . . . .	5
1.4	Differenzierung von Osteoklasten. . . . .	6
1.5	Darstellung eines Gelenks. . . . .	8
1.6	Hypothese zur Einwirkung ionisierender Strahlung mit niedrigen Dosen auf die im Knochenmetabolismus relevante Zellen. . . . .	12
1.7	Dosisverteilung in dünn und dicht-ionisierender Strahlung. . . . .	17
1.8	Energiedeposition von Röntgenstrahlen und Kohlenstoff-Ionen. . . . .	18
1.9	Zerfallsreihe von Radium-226. . . . .	18
2.1	Schematische Darstellung der Abstammung von verwendeten Zellen . . . . .	24
2.2	Phänotypisierung der humanen mesenchymalen Stammzellen . . . . .	27
2.3	Alcianblau Färbung der Chondrozyten . . . . .	28
2.4	Alizarin Red S Färbung der Osteoblasten . . . . .	29
2.5	Oil Red O Färbung der Adipozyten . . . . .	30
2.6	TRAP-Färbung der Osteoklasten . . . . .	31
2.7	F-Aktin Färbung der Osteoklasten . . . . .	31
2.8	Toluidinblau Färbung der Knochenplättchen . . . . .	32
2.9	Durchflusszytometrische Auswertung der intrazellulären Antikörperfärbung von Th17 und Treg Zellen . . . . .	33
2.10	Durchflusszytometrische Apoptose-Messung in humanen Monozyten mittels Annexin V-Färbung . . . . .	33
2.11	Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse . . . . .	34
2.12	Schematische Darstellung des Fluoreszenz-basierten Bead Immunoassays . . . . .	36
2.13	Osteoblasten-Kolonie . . . . .	41
3.1	Durchflusszytometrische Phänotypisierung humaner mesenchymaler Stammzellen. . . . .	44
3.2	Nachweis der Multipotenz humaner mesenchymalen Stammzellen . . . . .	45
3.3	Wachstum humaner primärer Osteoblasten nach Röntgenbestrahlung . . . . .	46
3.4	Zellzyklusverteilung in humanen primären Osteoblasten nach Röntgenbestrahlung . . . . .	47
3.5	Klonogenes Überleben der bestrahlten Osteoblasten . . . . .	47
3.6	Relative Expression der Gene in humanen Osteoblasten nach Bestrahlung . . . . .	49

3.7	Veränderung der alkalischen Phosphatase-Konzentration (ALP) in bestrahlten Osteoblasten . . . . .	50
3.8	Ca <sup>2+</sup> -Einlagerungen in bestrahlten Osteoblasten . . . . .	50
3.9	Zytokinfreisetzung humaner Osteoblasten nach Bestrahlung . . . . .	51
3.10	Apoptose in Osteoklastenvorläuferzellen . . . . .	52
3.11	Anzahl ausdifferenzierter Osteoklasten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung .	53
3.12	Anzahl ausdifferenzierter Osteoklasten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung .	54
3.13	Resorbierte Fläche durch bestrahlte Osteoklasten . . . . .	54
3.14	Konzentration der freigesetzten Kollagenfragmente der bestrahlten Osteoklasten	55
3.15	Proteinexpression in Osteoklasten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung . . .	56
3.16	Quantifizierung der Proteinexpression in Osteoklasten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung . . . . .	56
3.17	TRAP-Aktivität in Osteoklasten . . . . .	57
3.18	Zellzahlen der Lymphozyten nach Bestrahlung . . . . .	58
3.19	Differenzierung von Treg und Th17 Zellen nach Bestrahlung. . . . .	59
3.20	Verhältniss der differenzierten Treg und Th17 Zellen nach Bestrahlung unter TGF $\beta$ - und TNF $\alpha$ -Einwirkung . . . . .	61
3.21	Freisetzung von IL-10 in bestrahlten CD4 <sup>+</sup> T-Zellen . . . . .	62
3.22	Freisetzung von Th17-spezifischen Zytokinen in bestrahlten CD4 <sup>+</sup> T-Zellen . . .	63
3.23	Freisetzung von IL-2 und IL-4 in bestrahlten CD4 <sup>+</sup> T-Zellen . . . . .	64
3.24	Verteilung der T-Zellen in Patientenblut. . . . .	65
3.25	Analyse der Patientenseren . . . . .	66
4.1	Relatives Überleben der Zellen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung . . . . .	69
4.2	Differenzierungsprozess von MSCs zu Osteoblasten . . . . .	70
5.1	Auswirkungen einer Niedrig-Dosis Therapie . . . . .	83

# Tabellenverzeichnis

1.1	Im Knochenmetabolismus relevante Zytokine. Modifiziert aus [98] . . . . .	11
1.2	Medikamente in RA und ihre Nebenwirkungen. . . . .	14
2.1	cDNA Synthese. . . . .	38
2.2	PCR-Ansatz . . . . .	38
2.3	Gene-Cycler Programm für two-step RT-PCR . . . . .	39
2.4	Einsaat der Osteoblasten zur Bestimmung des klonogenen Überleben . . . . .	41
3.1	Einwirkung von Röntgenbestrahlung auf die Freisetzung der Zytokine der Th17/Treg Zellkultur. . . . .	62
4.1	Zusammenfassung der Literatur über strahleninduzierte Osteoklastenbildung . .	75
6.1	Puffer und Lösungen . . . . .	85
6.2	Chemikalien . . . . .	86
6.3	Zellkulturmedien . . . . .	89
6.4	Färbelösungen . . . . .	90
6.5	Antikörper . . . . .	90
6.6	Antikörper-Kits . . . . .	90
6.7	Elisa Kits . . . . .	90
6.8	Verbrauchsgegenstände . . . . .	91
6.9	Geräte . . . . .	91



# Zusammenfassung

Störungen des fein regulierten Gleichgewichts zwischen Aufbau und Abbau von Knochensubstanz stehen im Zusammenhang mit chronischen Entzündungskrankheiten wie rheumatoide Arthritis oder Morbus Bechterew. Chronisch entzündliche Prozesse werden mit entzündungshemmenden Medikamenten, aber auch mit ionisierender Bestrahlung therapiert, da man aus klinischer Erfahrung weiß, dass niedrige Dosen eine schmerzlindernde und entzündungshemmende Wirkung haben. Dabei werden z.B. Gelenke lokal mit Photonen bestrahlt oder der gesamte Körper mittels Inhalation des  $\alpha$ -Emitters Radon behandelt. Trotz der klinischen Erfolge sind die zellulären und molekularen Wirkmechanismen weitgehend ungeklärt. Aus diesem Grund wird bei GSI die Thematik mit Photonen und dicht-ionisierender Strahlung (v.a. Radon) untersucht.

Entzündliche Prozesse sind eng an die Regulation des Knochenmetabolismus gekoppelt, die im Knochenmark stattfindet. Aufgrund der anti-entzündlichen Wirkung von Bestrahlung bei muskuloskelettalen Erkrankungen, beruht die Arbeitshypothese dieser Arbeit darauf, dass die Strahlung einen Einfluss auf die Regulation des Knochenmetabolismus hat. In Rahmen dieser Arbeit wurde die Isolierung humaner mesenchymalen Stammzellen (MSC) aus dem Knochenmark gesunder Spender (in Zusammenarbeit mit dem Institut für Transfusionsmedizin, Universität Frankfurt) und deren Differenzierung zu Osteoblasten (OB) etabliert. Die Differenzierung und die Gewinnung von Osteoklasten (OC) und Tregs erfolgte aus angereicherten Blutproben (Buffy coat). Neben *in vitro* Studien wurden im Rahmen der Patientenstudie RAD-ON01 (Zusammenarbeit Universitätsklinikum Erlangen) Blutproben von Patienten nach Radon-Therapie untersucht.

Die beschleunigte Differenzierung der OB zeigte sich nach Niedrig-Dosis Bestrahlung (0.5 Gy Röntgenstrahlung) durch leicht erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors Runx2, welcher für die Differenzierung von Osteoblasten verantwortlich ist. Zusätzlich wurde eine signifikant verstärkte  $\text{Ca}^{2+}$  Einlagerung in Osteoblasten nach Bestrahlung (0.5 Gy) festgestellt. Um die Auswirkungen von Bestrahlung auf die Osteoklastogenese zu untersuchen, wurde die Freisetzung des löslichen OPG-Rezeptors von OB, welche die Differenzierung von OC inhibiert, untersucht. Es zeigte sich, dass nach Bestrahlung mit 0.5 Gy Röntgenstrahlung die Freisetzung von OPG durch OBs signifikant zunimmt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Bestrahlung eine Beschleunigung der OB-Differenzierung zur Folge hat und somit der Osteoklastogenese entgegenwirken könnte. Für hohe Dosen der Röntgenstrahlung (10 Gy) wurde teilweise gleicher Effekt wie für 0.5 Gy beobachtet.

Die Bestrahlung von Osteoklastenvorläufern mit 0.5 Gy Röntgenstrahlung hatte keine Aus-

wirkung auf die Bildung und Differenzierung von Osteoklasten *in vitro*. Die resorbierende Aktivität der Osteoklasten auf Knochenplättchen als physiologisches Substrat wurde jedoch nach Bestrahlung mit 0.5 Gy Röntgenstrahlung signifikant reduziert. Diese Ergebnisse sind konsistent mit *in vivo* Untersuchungen der Patientenproben. Im Blut von Patienten wurde eine signifikante Abnahme von Kollagenfragmenten, die während des Knochenabbaus entstehen festgestellt. Es könnte auf eine Reduktion der Aktivität von OC hindeuten und steht im Einklang mit *in vivo* Untersuchungen an bestrahlten polyarthritischen Mäusen (hTNFtg), welche nach Bestrahlung mit 0.5 Gy Röntgenstrahlung eine Zunahme der Knochendichte bei gleichzeitiger Abnahme der OC-Aktivität zeigten (Universität Erlangen). Die Bestrahlung mit hohen Dosen (10 Gy) inhibierte hingegen nicht nur die Differenzierung sondern auch die Aktivität von Osteoklasten.

Eine potentielle Auswirkung von Bestrahlung auf die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> unreifen T-Lymphozyten in anti-entzündliche Treg Zellen wurde zusätzlich untersucht, da Treg Zellen nach aktuellem Kenntnisstand inhibierend auf die Osteoklastogenese einwirken können. *In vitro* Ergebnisse zeigten, dass die Bestrahlung mit hohen Dosen (10 Gy) eine signifikante Zunahme der anti-entzündlichen Treg Population bewirkt, während 0,5 Gy Röntgenstrahlung erst mit Zusatz von TGF $\beta$ , welches im Serum von Radonpatienten erhöht vorliegt, eine Zunahme von Treg zur Folge hat. Im Blut von Patienten wurde ebenfalls eine Zunahme von Treg-Zellen nach Radon-Therapie gemessen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte *in vitro* in primären humanen Zellen eine strahleninduzierte beschleunigte Differenzierung von OBs und eine bevorzugte Reifung von T-Zellen in anti-entzündliche Treg Zellen sowie eine Abnahme der Osteoklastenaktivität gezeigt werden. Dies könnte eine zelluläre und molekulare Grundlage der *in vivo* beobachteten positiven Effekt der niedrig-Dosis Bestrahlung sein.

Diese Arbeit wurde mit Unterstützung von Bundesministerium für Bildung und Forschung (Grewis, 02NUK017A) angefertigt.

# Summary

Disorders of highly regulated balance between remodeling and degradation of bone are associated with chronic inflammatory diseases such as Rheumatoid Arthritis or Ankylosing Spondylitis. Chronic inflammatory responses are treated with anti-inflammatory drugs, but also with ionizing radiation, clinical studies have shown that low doses relieve pain and help fight inflammation. Therefore joints are locally irradiated with photons or the whole body treated by inhalation of  $\alpha$ -emitter radon. Despite the clinical successes, the cellular and molecular mechanisms are largely unknown. For this reason, the issue with photons and densely-ionizing radiation (mostly radon) is researched at GSI.

Inflammatory processes are closely linked to the regulation of bone metabolism that occurs in the bone marrow. Due to the anti-inflammatory effect of irradiation in musculoskeletal disorders the working hypothesis of this work is that the radiation has an effect on the regulation of bone metabolism. In this study, the isolation of human mesenchymal stem cells (MSC) from the bone marrow of healthy donors (in collaboration with the Institute for Transfusion Medicine, University of Frankfurt) and their differentiation into osteoblasts (OBs) was established. The differentiation and the enrichment of osteoclasts (OCs) and Tregs was performed from blood (buffy coat). Additionally blood samples from radon patients in frame of the RAD-ON01 study were analyzed (collaboration with Erlangen University Hospital). Accelerated differentiation of OBs was observed after low-dose of irradiation (0.5 Gy X-ray), due to increased expression of the transcription factor Runx2, which is responsible for the differentiation of osteoblasts. In addition, a significantly increased  $\text{Ca}^{2+}$  incorporation into osteoblasts after irradiation (0.5 Gy) was found. To investigate the impact of irradiation on osteoclastogenesis, the release of OPG from OBs, which inhibits the differentiation of OCs was examined. It was found that after irradiation with 0.5 Gy of X-ray radiation the release of soluble OPG by OBs increased notably. These results suggest that the irradiation accelerate differentiation of OBs and thus could counteract osteoclastogenesis. Also after irradiation with high doses (10 Gy) several effects were similar to that at 0.5 Gy.

Irradiation of osteoclast precursors with 0.5 Gy X-rays have had no effect on the formation and differentiation of osteoclasts *in vitro*. But the resorbing activity of osteoclasts on bone slices was significantly reduced after irradiation with 0.5 Gy X-rays. These results are in line with *in vivo* data from patients. A significant decrease of collagen fragments (CTX) was detected in blood of patients following therapy. It indicates a reduction of OCs activity and is consistent with studies on irradiated polyarthritic mice (hTNFtg), which showed an increase in bone density together with a decrease in OC activity after irradiation with 0.5 Gy

X-rays (University of Erlangen). Irradiation of osteoclasts with high doses (10 Gy) inhibited not only differentiation but also activity of the cells. A potential effect of irradiation on the differentiation of CD<sup>4+</sup> immature T lymphocytes in anti-inflammatory Treg cells was also examined, since Treg cells on the current state of knowledge could have an inhibitory effect on osteoclastogenesis. *In vitro* results showed that the high dose irradiation (10 Gy) causes a significant increase in anti-inflammatory Treg population, while 0.5 Gy X-ray irradiation with the addition of TGF $\beta$  only, which is increased in the serum of patients, increased Tregs population. These results are consistent with those obtained in the *in vivo* data. In the blood of patients an increase of Treg cells was observed. In this work, a radiation-induced accelerated differentiation of OBs and preferential maturation of T-cells in anti-inflammatory Treg cells and a decrease of osteoclast activity was demonstrated in the *in vitro* system along with primary human cells. This could be a cellular and molecular basis of the observed beneficial effect of low-dose irradiation *in vivo*.



# Kapitel 1

## Einleitung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Strahlung auf die Regulation des Knochenmetabolismus untersucht. Deshalb werden im folgenden Abschnitt grundlegende Aspekte des Knochenaufbaus erklärt, sowohl die strukturellen als auch die zellulären Bestandteile. Hierbei wird ein Hauptaugenmerk auf die Differenzierung von Knochenzellen gelegt, wie sich die Knochenzellen untereinander beeinflussen können, und welche Faktoren daran beteiligt sind. Außerdem wird ein Zusammenhang zu entzündlichen Erkrankungen des Knochens hergestellt sowie mögliche Therapien angesprochen.

### 1.1 Struktureller Aufbau des Knochens

Das Knochengewebe ist ein komplexes und dynamisches Gewebe, welches ungefähr 18% des Körpergewichts ausmacht. Neben der wichtigen Stützfunktion bietet das Knochengewebe einen Schutz für die inneren Organe gegenüber Verletzungen. Es beherbergt zudem das Knochenmark mit der darin stattfindenden Blutbildung (Hämatopoese) und speichert wichtige Mineralien wie Calcium und Phosphat [1].

Die vielen wichtigen Funktionen legen nahe, dass der Knochen kein einheitliches Gewebe darstellt. Vielmehr besteht das Knochengewebe aus drei verschiedenen Arten an Knochen. Sie werden unterteilt in lange, kurze und flache Knochen. Die Langknochen wie z.B. Femur, Tibia, Ulna und Radius sind in der Länge ausgedehnt und breit und absorbieren die Belastung durch das Körpergewicht an verschiedenen Stellen. Die Kurzknochen sind ungefähr gleich lang wie breit und bestehen nur aus einer dünnen Schicht „Compacta“ (z.B. Handwurzelknochen), während die Flachknochen dünn sind und aus zwei parallelen Kompaktknochenplatten bestehen, die von einer dünnen Schicht aus Spongiosa umschlossen werden [2, 3].

Am Beispiel des Langknochens lässt sich die makroskopische Struktur des Knochens verdeutlichen. Wie in der Abb.1.2 dargestellt, besteht die makroskopische Struktur der Langknochen aus einem langen, zylindrischen Hauptanteil, der die Knochenmarksnische enthält (Diaphyse). Das Knochenmark der Diaphyse ist mit einer dünnen Membran (Endosteum) umgeben. Seinen Abschluss findet dieser zylindrische Teil in den distalen und proximalen Enden des Knochens (Epiphysen), die einen spongiösen (schwammartigen) Knochenabschnitt darstellen. Die Region, in welcher diese beiden Abschnitte aufeinander treffen wird Metaphyse genannt. Weiterhin

befindet sich in den Epiphysen der Gelenkknorpel, welche die Enden der Epiphyse über-schichtet. An den Stellen an denen kein Gelenkknorpel vorhanden ist, wird der Knochen mit einer Bindegewebeschicht überzogen (Periosteum). In dieser dünnen Bindegewebschicht sind die knochenaufbauende Zellen (Osteoblasten), welche den Knochen in die Breite aufbauen [3, 4].

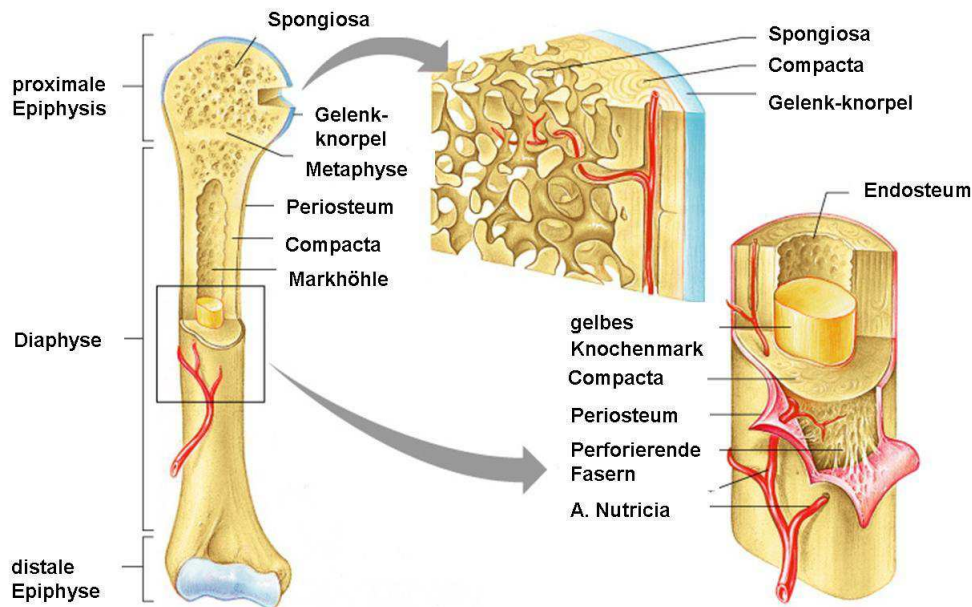


Abbildung 1.1: Bestandteile eines Langknochens. Copyright © Pearson Education, Inc., publiziert von Benjamin Cummings

Der Knochen besteht größtenteils aus kompaktem Knochen und nur zu einem geringen Anteil aus spongiösen (schwammartigen) Knochenabschnitten. Wie in Abbildung 1.2 dargestellt wird der kompakte Teil von Blutgefäßen und Nerven durch die Volkmann-Kanäle (*canalis perforans*) durchdrungen. Die Volkmann-Kanäle sind mit Endosteum ausgekleidet und verbinden sich mit anderen Kanälen aus dem Markraum, des Periosts und der Zentralkanäle (*canalis centralis*). Die Zentralkanäle sind von Lamellen (*lamellae*) umschlossen, welche Ringe aus kalzifizierter Matrix um die Zentralkanäle bilden. Zwischen den Lamellen befindet sich ein Zwischenraum (Lacuna), der die Osteozyten enthält. Die Osteozyten, welche von Osteoblasten stammen und nun in der mineralisierten Knochenmatrix residieren, bilden Ausläufer, die sich in die feinen Kanäle (*canaliculi*) der Lamellen zur Kommunikation mit benachbarten Osteozyten erstrecken. Die feinen Kanäle bilden so ein komplexes Netzwerk durch den gesamten Knochen, welches für die Nährstoffversorgung sowie die Kommunikation zwischen den Zellen notwendig ist. Eine Einheit aus Blutgefäßen, mehreren Lamellen und dazugehörigen Osteozyten wird **Osteon** genannt. Die Generallamellen (*lamellae circumferantes*) liegen direkt unterhalb des Periosts. Der kompakte Knochen besteht aus mehreren Osteonen, die sich nach

Belastungslinien ausrichten [4, 5].

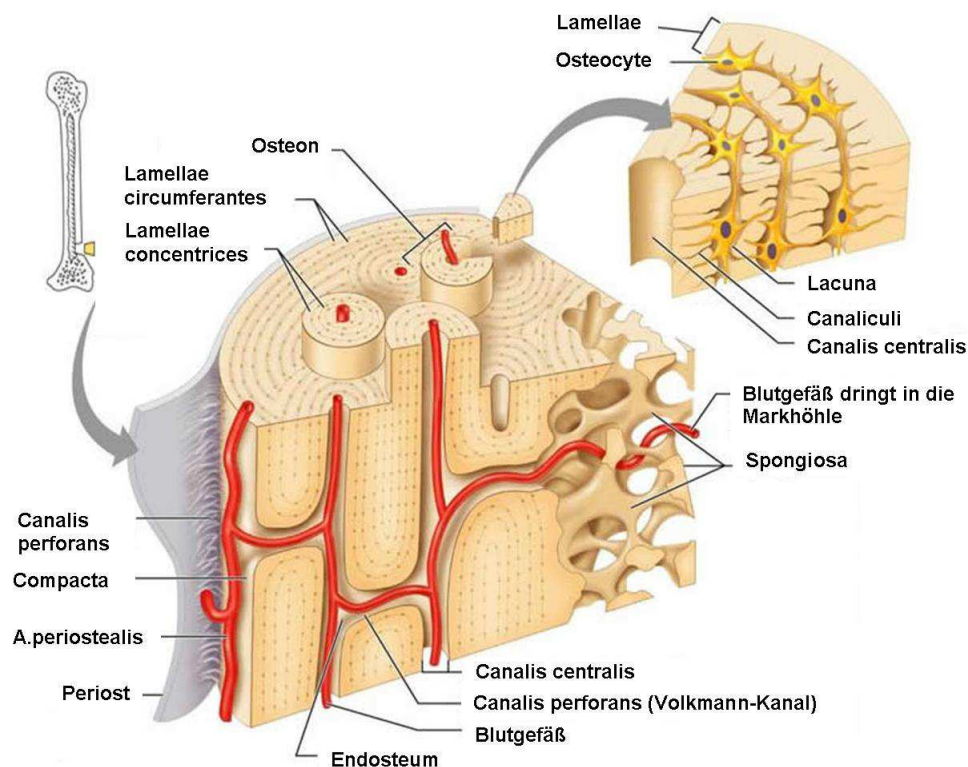


Abbildung 1.2: Kompakter Knochen. Copyright © Pearson Education, Inc., publiziert von Benjamin Cummings

Der spongiöse Knochen (**Trabeculae**) enthält keine Osteone, sondern nur Verzweigungen der Lamellen-Trabekeln. Im Inneren der Lamellen-Trabekeln befinden sich Lacunen mit Osteocyten, welche über die *canaliculi* mit Nährstoffen direkt aus dem Blut des Knochenmarks versorgt werden. In den Zwischenräumen der Trabekel befindet sich das rote und später vorwiegend gelbe Knochenmark, der Ort der Blutbildung (Hämatopoese). Unterschieden werden rote und gelbe Abschnitte, da mit zunehmenden Alter das blutbildende (rote) Knochenmark durch Fettgewebe (gelb) ersetzt wird [6].

Neben diesen strukturellen Eigenschaften des Knochens kann das Knochengewebe auch nach molekularen Kriterien unterteilt werden. Das Knochengewebe besteht aus einer extrazellulären Matrix, die sich zu 25% aus Wasser, zu 25% aus Kollagenfasern und zu 50% aus Mineralsalzen zusammensetzt. Zu den Mineralsalzen gehört unter anderem Calciumphosphat  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , welches sich mit Calciumhydroxid  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  zu Hydroxyapatitkristallen verbindet. Neben Calcium können auch andere Ionen wie Magnesium, Fluorid, Natrium und Sulfat Kristallbildungen eingehen. Diese Mineralsalze lagern sich zwischen den Kollagenfasern ab, kristallisieren dort und verhärten somit das Gewebe [2]. Ungefähr 99% des im Körper befindlichen Calciums sind in Knochen inkorporiert. Somit dient der Knochen als Speicher für Calcium und auch Phosphat, welche aus der Knochenmatrix heraus wieder ins Blut freigesetzt werden

können. Damit hat der Knochen neben einer stützenden Funktion auch eine regulierende Aufgabe, nämlich der Homöostase von Calcium im Blut [7]. Der Kalzifizierungsprozess wird von knochenbildenden Osteoblasten gesteuert, während der Abbau des Knochens durch Enzyme und Säuren gesteuert wird, die von knochenresorbierenden Osteoklasten gebildet werden [4].

### 1.1.1 Knochenmetabolismus und Entwicklung der Knochenzellen

Am Knochenmetabolismus sind die unterschiedlichsten Zelltypen beteiligt (z.B. Osteoblasten, Osteoklasten, Immunzellen). Da im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von Strahlung auf die Differenzierung von Osteoblasten, Osteoklasten und T-Zellen untersucht wird, soll im Folgenden auf deren Differenzierung und beteiligte Faktoren näher eingegangen werden.

Die knochenaufbauenden Osteoblasten (OBs) differenzieren aus multipotenten mesenchymalen Stammzellen (MSCs). In Abb.1.3 ist der Einfluss von verschiedenen Faktoren auf deren Differenzierung schematisch dargestellt. Unterschiedliche Signalmoleküle wie z.B. TGF $\beta$ , BMPs (bone morphogenic proteins) [8] und Wnt (wingless) [9] aktivieren in den unreifen MSCs bestimmte Transkriptionsfaktoren und leiten somit die Ausreifung und Differenzierung in Osteoblasten ein. Die Vorläuferzellen der reifen Osteoblasten (Pre-Osteoblasten) differenzieren weiter, ebenfalls unter Einwirkung der verschiedensten Botenstoffe wie von VitD3 (1,25-Dihydroxyvitamin D3) und PTH (parathyroid hormone) und IGF (insulin like growth factor), zu reifen Osteoblasten [10, 11]. Dieser Prozess ist komplex und wird durch die Transkriptionsfaktoren RUNX2 und Osterix geleitet. Diese Transkriptionsfaktoren sind teilweise von BMPs, TGF $\beta$  und Wnt abhängig [12–14].

Da die Transkriptionsfaktoren Runx2 und Osterix die Differenzierung entscheidend beeinflussen, wurden sie im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht. Runx2 wird über  $\beta$ -Catenin und Smad aktiviert und führt zur Transkription von Osteocalcin (OCN), Osteopontin (OPN), Collagen I und Bone sialoprotein (BSP) [15]. Neben Runx2 ist Osterix ein wichtiger Transkriptionsfaktor in der Differenzierung der Osteoblasten. Osterix ist ein nachgeschaltetes Gen von Runx2 und bildet mit Nfatc1 ein DNA-Bindungsfragment, welches zur Collagen-I Expression führt [13, 16]. Reife Osteoblasten exprimieren ALP, Collagen I und BSP. In der weiteren Entwicklung werden zusätzlich OPN, OCN, RANKL und OPG (osteoprogenitor) sowie M-SCF exprimiert [17]. Mittels dieser Faktoren sowie durch die Zunahme an Ca<sup>2+</sup>-Einlagerungen wird Knochenmatrix mineralisiert und die Osteoklastogenese gesteuert (siehe Abb.1.3).

Die knochenabbauenden Osteoklasten sind multinukleäre Riesenzellen, welche wie in Abbildung 1.4 dargestellt aus den Monozyten hervorgehen. Um die Differenzierung von OCs über mehrere Zellstadien hin zu aktivieren, sind hauptsächlich zwei Faktoren, M-CSF und RANKL, notwendig [19–21]. Beide Faktoren werden von den im Knochenmark umliegenden Osteoblasten und Stromazellen produziert. Hierbei reguliert M-CSF, das neben der Differenzierung auch an der Proliferation der Osteoklasten beteiligt ist, die Expression von RANK [18]. Während der Differenzierung von Monozyten zu Osteoklasten löst die Bindung von RANKL an RANK in Monozyten eine Signalkaskade über TRAF6, NF $\kappa$ B, AP-1 und NFATc1 aus

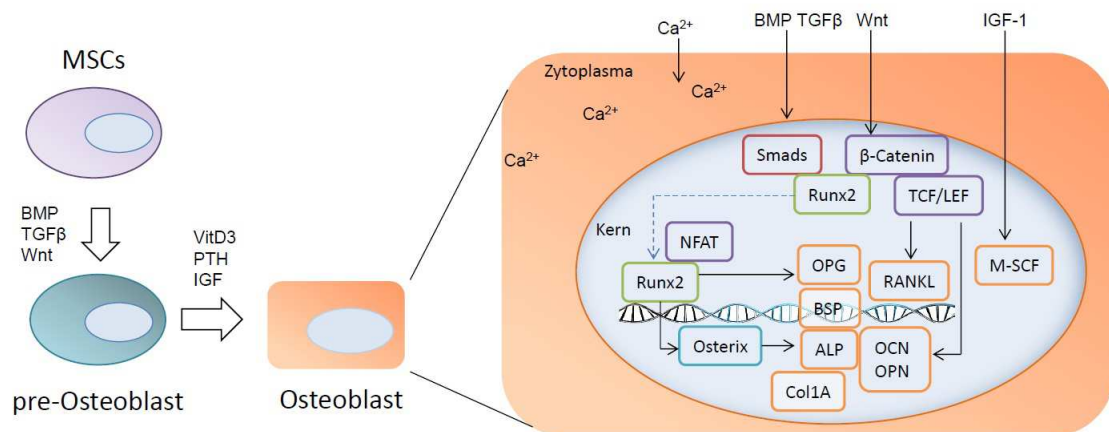


Abbildung 1.3: Differenzierung von Osteoblasten. MSCs differenzieren unter Einfluss von BMP, TGFβ und Wnt zur pre-Osteoblasten. Dabei werden Signalwege über β-Catenin und Smad aktiviert. Die beiden Proteine interagieren mit Transkriptionsfaktor Runx2 und führen zur Expression der Gene von OCN, OPN, Col1A und BSP. Osterix stellt einen Downstream faktor von Runx2 und ist für Expression von Col1A sowie ALP notwendig. Wnt/β-Catenin Signalweg beeinflusst die Expression von RANKL und OPG, welche Osteoklastogenese regulieren. Während der Differenzierung lagern Osteoblasten zunehmend  $\text{Ca}^{2+}$  ein und mineralisieren dadurch die Knochenmatrix. Modifiziert aus [18].

[22–24]. Bei der Bindung von RANKL an RANK-Rezeptor von Osteoklasten, wird **TRAF6** zu RANK rekrutiert und bildet dann mit anderen TRAF6-Molekülen ein Trimer aus, was zu einer Aktivierung von NFκB und MAPKs (mitogen activated kinases) führt [25, 26]. Die Bindung von RANKL kann durch Osteoblasten exprimiertes OPG inhibiert werden und somit die Osteoklastogenese inhibieren [27].

Reife Osteoklasten exprimieren zudem c-Src [28], ClC-7 [29] sowie Atp6i [30] und Cathepsin K [31]. **C-Src** ist ein Haupteffektor des durch den Vitronectin Rezeptor  $\alpha\text{v}\beta 3$ -initiierten Signals und ist in die Regulierung des Zytoskeletts sowie Zellmigration involviert [32, 33]. Es wurde gezeigt, dass Osteoklasten aus c-Src defizienten Mäusen sich nicht richtig auf der Knochenoberfläche ausbreiten können, über abnormale F-Aktin Organisation verfügen und infolgedessen weniger mobil als die Wildtyp-Osteoklasten sind [34, 35]. Aufgrund der defekten Bildung von Adhäsionskomplexen ist die Endo- und Exozytose gestört, was zu einer geringeren Resorptionsfähigkeit führt [36, 37]. Die abgebauten Kollagenfragmente werden über Endozytose von Osteoklasten aufgenommen und über Exozytose nach außen transportiert. Die Resorption des Knochens erfolgt vorwiegend durch das Enzym Cathepsin K. **Cathepsin K** ist eine Endoprotease, welche im sauren Milieu des Lysosoms Kollagen I aus Knochen spalten kann [38]. Die Expression von Cathepsin K ist im Wesentlichen vom RANKL-TRAF6 Signalweg abhängig [39]. Die Aktivierung von NFκB und p38 sowie die Induktion der c-Fos Expression fördern die Cathepsin K-Expression [40, 41].

### Knochenremodullierung

Knochen wird kontinuierlich auf- und abgebaut. Dieser Prozess wird als Knochenremodellierung



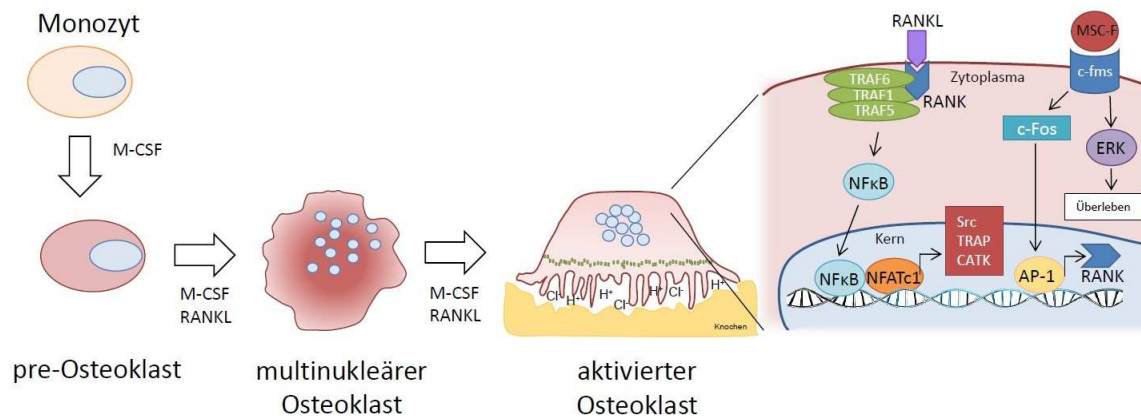


Abbildung 1.4: Differenzierung von Osteoklasten. Monozyten differenzieren zur Osteoklasten unter Einwirkung von MCS-F und RANKL. MCS-F ist für Proliferation und Überleben der Monozyten notwendig, während RANKL über eine Bindung an RANK-Rezeptor eine Signalkaskade des NFκB-Signalwegs ausgelöst. Interaktion von NFκB und NFATc1 führt zur Genexpression von c-Src, Cathepsin K oder TRAP. Die Expression dieser Proteine führt zur vollständigen Aktivität reifen Osteoklasten. Ein ausgebildeter F-Aktinring ist für Anheftung der Zellen an Knochenmatrix notwendig. In der *ruffled border* wird mittels Enzyme sowie einen sauren Milieu die Knochenmatrix abgebaut. Modifiziert aus [42].

(engl: bone remodelling) bezeichnet. Dabei besteht ein Gleichgewicht zwischen knochenaufbauender Aktivität der Osteoblasten und knochenabbauender Aktivität der Osteoklasten. In einem Jahr werden bis zu 10% der Knochenmasse umgebaut und bestimmte Knochenabschnitte werden schneller erneuert als andere. Osteoblasten und Osteoklasten regeln den Knochenumbau indem sie entweder direkt über Zell-Zell-Kontakte miteinander kommunizieren oder über die Freisetzung von Zytokinen. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, werden die Osteoklasten mit dem Zytokin M-CSF und über die RANK-RANKL Bindung zur Differenzierung aktiviert. RANK-Ligand wird nicht nur durch Osteoblasten freigesetzt, sondern auch von T-Zellen, synovialen Fibroblasten und Chondrozyten [43, 44]. Auf diesen Zellen wird der Ligand auf der Oberfläche präsentiert oder durch TACE-Metalloprotease (TNF $\alpha$  convertase) abgespalten [45]. In *in vitro* Experimenten wurde gezeigt, dass sowohl ein direkter Zell-Zell Kontakt zwischen Osteoblasten und Osteoklasten als auch lösliches RANKL, die Differenzierung von Osteoklasten einleiten kann (zusammengefasst in [46]). Die Expression von RANKL kann durch verschiedene Faktoren wie VitD3, IL-1, IL-6, IL-11, IL-17, TNF $\alpha$ , PGE2 oder PTH hochreguliert werden [47]. Mit der Bindung von RANKL wird in den Osteoklasten eine Signalkaskade ausgelöst, die schließlich zur Umstrukturierung des Zytoskeletts führt. Hierbei wird ein Aktin-Podosomen-Ring in der Zelle ausgebildet, welche eine spezielle Domäne der Plasmamembran (*ruffle border*) umschließt. Dadurch wird eine Mikroumgebung zwischen Osteoklasten und Knochenmatrix gebildet [48]. In dieser Umgebung herrscht ein niedriger pH-Wert, welcher für den Abbau von Knochen notwendig ist [49]. Zudem bietet der niedrige pH Wert optimale Bedingungen für knochenabbauende Enzyme. Der Knochenabbau dauert zwischen 2-4 Wochen. Durch beim Knochenabbau freigesetzte Zytokine, welche in der Kno-

chenmatrix eingebunden sind, werden Vorläufer-Osteoblasten zur Lakune (resorbierte Fläche) rekrutiert, welche dort differenzieren und die Knochenmatrix innerhalb von 2-4 Monaten neu mineralisieren [50].

## 1.2 Muskuloskelettale Erkrankungen

Muskuloskelettale Erkrankungen betreffen die Strukturen die zur Körperhaltung beitragen und die Bewegungsorgane. Sie implizieren für den Betroffenen meistens Einschränkungen in der Beweglichkeit und sind zum Teil mit starken Schmerzen verbunden. Zu den muskuloskelettalen Erkrankungen zählen sowohl degenerative Gelenkerkrankungen (z.B. Arthrose), entzündliche Gelenkerkrankungen (z.B. rheumatoide Arthritis) und Skeletterkrankungen (z.B. Osteoporose). Es ist bisher bekannt, dass in manchen muskuloskelettalen Erkrankungen ein veränderter Knochenmetabolismus, insbesondere die Entartung der daran beteiligten Zellen zur Entstehung der Erkrankung führt. So konnte gezeigt werden, dass im Fall der Osteopetrose Osteoklasten weniger aktiv sind und es deshalb zur Verdickung der Knochen kommt [31]. In Patienten, die eine Osteoporose zeigen, liegt außerdem eine erhöhte Aktivität von Osteoklasten vor und somit kommt es zum Knochenschwund. Eine andere Erkrankung, die durch eine gesteigerte OC Aktivität hervorgerufen wird und zu strukturellen Knochenschäden führt ist Gicht (Urikopathie). Während der Erkrankung lagern sich vermehrt die Harnsäurekristalle (Urat) in die Gelenke ein (vorwiegend im Fuß), welche dann eine Entzündung hervorrufen. Die entstehenden Knochenschäden sind Folge der Entzündung und einer gesteigerten Aktivität von Osteoklasten [51]. Eine andere muskuloskelettale Erkrankung ist die rheumatoide Arthritis, welche ebenfalls mit Entzündungen der Knochengelenke sowie Gelenkschäden einhergeht. In Rahmen dieser Arbeit wurde die molekulare Grundlage der rheumatoiden Arthritis für die Erforschung der Radon-Therapie verwendet. Deshalb wird im Folgenden auf die Erkrankung näher eingegangen.

### 1.2.1 Rheumatoide Arthritis

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronische, progressive, entzündliche Autoimmunerkrankung die mit artikulären, extraartikulären und systemischen Manifestationen assoziiert ist. Etwa 1% der Bevölkerung ist von der Erkrankung betroffen [52]. Da im Verlaufe der Krankheit die erosive Gelenkdestruktion zunimmt, sind die Patienten in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt. Die Todesrate ist doppelt so hoch wie die der Allgemeinbevölkerung [53]. Die Ursache der Erkrankung ist bis jetzt unklar. Es gibt jedoch Hinweise, dass Menschen mit spezifischen Blutgruppenmerkmalen häufiger von der Erkrankung betroffen sind. So konnte in genetischen Untersuchungen des Blutes gezeigt werden, dass mehr als 80% der an RA Patienten veränderte Allele der HLA-DRB1-Region (Klasse II Human Leukozyte Antigen) tragen [54, 55]. Diese HLA-Klasse II-Moleküle präsentieren Antigene (z.B. citrullinierte Proteine, CRP) für T-Helferzellen und lösen so eine Immunreaktion aus. Dies könnte zur Aktivierung von T-Zellen und zur Freisetzung von entzündlichen Zytokinen führen, welche die Entstehung der Krankheit erklären könnten. Aber auch Umweltfaktoren wie Rauchen und Infektionen können die Entstehung, den Fortschritt und Schweregrad der RA beeinflussen [56, 57]. Unterschiedliche Faktoren

werden diskutiert, die in der Pathologie der Erkrankung involviert sein könnten, wie z.B. die Entartung von Effektorzellen, in denen dann Signalwege und infolgedessen Ausschüttungen von Zytokinen verändert sind. Bislang ist nur bekannt, dass die komplexe Interaktion zwischen den Zytokinen und Immunzellen zu Schäden am Gelenk führt, welches an der synovialen Membran beginnt. Dies ist schematisch in Abb.1.5 gezeigt. Dabei wird die synoviale Membran hyperplastisch (Synovitis) aufgrund des Einwandern und Aktivierung von B-Zellen, T-Zellen, dendritischen Zellen (DC), Makrophagen und Mastzellen sowie durch verstärkte Angiogenese. An der Membran angelagerte Osteoklasten bauen den Knochen dann letztendlich ab, während durch synoviale Fibroblasten (Synoviozyten) und Granulozyten freigesetzte MMPs das Gelenk abbauen [54]. Durch diese veränderte Reaktion der Zellen entstehen schlussendlich typische Symptome einer Entzündung wie Schwellung des Gelenks und damit einhergehende Schmerzen. Im Patienten werden Synovitis sowie die Dauer und Schwere der Entzündung zur Beurteilung und Vorhersage der Gelenkschäden herangezogen [58, 59]. Die Gelenkschäden erfolgen schnell nach dem Ausbruch der Krankheit und betreffen die meisten Patienten bereits im ersten Jahr [60].

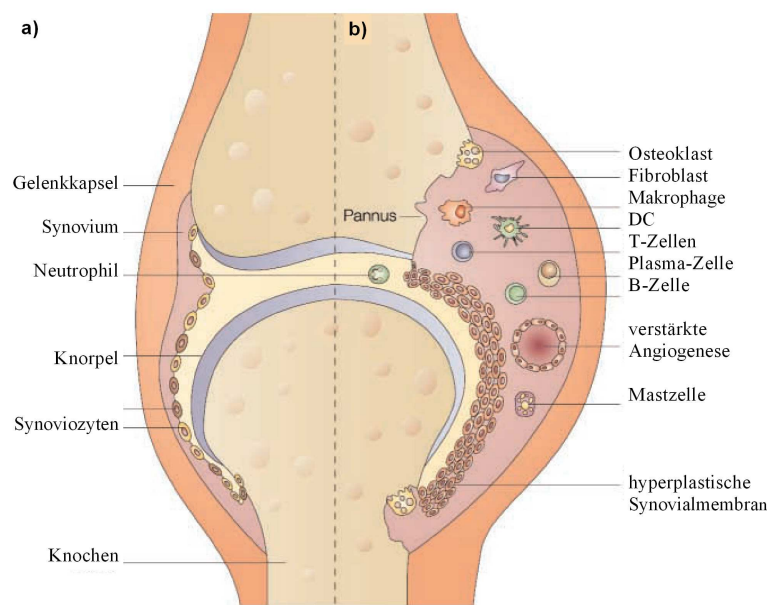


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung von gesunden (a) und einem an RA erkrankten Gelenk (b). Übernommen und modifiziert aus [54].

### 1.3 Rolle der T-Zellen bei entzündlichen Knochenerkrankungen

Wie bereits eingangs erwähnt, herrscht in einem gesunden Knochen eine dynamische Balance zwischen Osteoblasten und Osteoklasten. Diese Balance zwischen Knochenabbau und Knochen-



aufbau wird durch das endokrine System als auch das Immunsystem reguliert, insbesondere durch die Interaktion zwischen B- und T Zellen, dendritischen Zellen (DC) sowie Zytokinen, die durch die Immunzellen freigesetzt werden.

Zu Beginn der Entzündung erfolgt die Aktivierung der T-Zellen im Synovium durch Antigen-präsentierende B-Zellen und DC. Diese präsentieren auf ihrer Oberfläche HLA II und CD80/CD86 Moleküle. Der Zusammenhang zwischen RA und veränderten HLA-DRB1 Allelen, welches durch die polymorphe HLA Klasse II DR $\beta$ -Kette bestimmte Peptide präsentieren und somit die TCR Aktivierung der T-Zellen beeinflussen, deutet auf eine mögliche Ursache für Proliferation und Aktivierung von T-Zellen in RA hin. Die Rheumafaktoren und anti-CCP (citrullinierte Proteine) Antikörper werden ebenfalls durch Immunzellen produziert, welche zur Immunreaktion führen und als Nachweis für RA dienen. CCP entstehen durch die Citrullinierung von Proteinen- eine Deaminierung von Arginin zur Citrullin. Dadurch kommt es zur Strukturveränderungen des Proteins und der damit zusammenhängenden antigenen Eigenschaften [61]. Ein weiterer Zelltyp, der an der RA beteiligt ist sind B-Zellen. Diese exprimieren auf ihrer Zelloberfläche die Moleküle CD20 und CD22, welche wiederum eine Differenzierung der T-Zellen bewirken. Dadurch wird die Produktion von entzündlichen Zytokinen weiter stimuliert. Beide Prozesse, sowohl die T- als auch die B-Zell Aktivierung führen zu einem *feedback-loop*, wodurch weitere Immunzellen aktiviert werden.

Eine besondere Rolle im Synovitis sowie in vielen anderen entzündlichen und autoimmunen Erkrankungen spielen IL-17 produzierende CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Th17). Th17 wurden in der synovialen Flüssigkeit und dem peripherem Blut der RA-Patienten nachgewiesen, was auf die Involvierung der Th17 in die Pathologie der Erkrankung hindeutet [62, 63]. Th17 Zellen produzieren nicht nur IL-17, sondern auch RANKL, welches zur Knochendestruktion beiträgt [64]. Die genauere Auswirkung von entzündlichen Zytokinen wird im nachstehenden Kapitel 1.4 behandelt.

## 1.4 Rolle von Zytokinen in der Entwicklung von rheumatoider Arthritis

Es ist bekannt, dass Zytokine und Wachstumsfaktoren die Pathogenese von RA beeinflussen [65]. Die entzündlichen Zytokine wirken gezielt im Knochen an den betroffenen Stellen und beeinflussen den Knochenumbau sowie Immunzellen. Die Zytokine agieren über komplexe Signalwege, welche mit Entzündung sowie Gewebedegradation zusammenhängen.

Basierend auf den heutigen Erkenntnissen kann eine Unterteilung der entzündlichen Zytokine und der Zellen, die die Zytokine freisetzen in verschiedenen Gruppen erfolgen. So werden Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8, IL-17, TNF $\alpha$  als Osteoklastogenese-fördernd und IL-4, IL-10, IL-13, IL-18, IFN $\gamma$ , IFN $\beta$  als Osteoklastogenese-inhibierend angesehen. Ein Subtyp der T-Zellen wie Th1 und Th2 Zellen, die IL-4 und INF $\gamma$  produzieren werden deshalb zur Gruppe der Osteoklastogenese-inhibierenden Mediatoren gezählt [66, 67]. Während die Vertreter in den ersten beiden Gruppen dem Knochenaufbau oder Abbau zugeordnet werden können, gibt es eine dritte Gruppe an Zytokinen mit Vertretern wie IL-7, IL-12, IL-23, IL-6 und TGF $\beta$ , die sowohl den Knochenaufbau als auch den Knochenabbau fördern. Ihre Funktion hängt von der jeweiligen Konstellation in der Knochenumgebung sowie dem Entwicklungsstadium der

Osteoklasten ab [68–70] (Tab.1.1).

Der Einfluss der oben beschriebenen Zytokine auf die Entstehung und den Verlauf von entzündlichen Erkrankungen wurde in mehreren Studien untersucht. So konnte gezeigt werden, dass IL-1, welches in Form eines Polypeptides IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  vorliegt, vorwiegend von Makrophagen zur Stimulierung des Knochenabbaus freigesetzt wird [71], indem es die Aktivität von Osteoklasten steigert [72, 73]. IL-1 kann hierbei sowohl in der synovialen Membran, in der Gelenkflüssigkeit, als auch im Knorpel vorliegen. Zudem können IL-1 und TNF $\alpha$  Chondrozyten und Synoviozyten zur Produktion von IL-8 und IL-6 sowie MMPs stimulieren, die dann wiederum Entzündung und Abbau von Knorpel und Knochen begünstigen. Die Zugabe von anti-IL-1 und anti-TNF $\alpha$  Antikörper führte zu einer Abnahme der entzündlichen Faktoren [74, 75].

Ein wichtiges Interleukin, das am Entzündungsprozess beteiligt ist, ist IL-6. IL-6 wird vorwiegend von synovialen Fibroblasten freigesetzt, die während einer Erkrankung im Gelenkspalt verstärkt proliferieren, und führt zur Rekrutierung von Granulozyten und T-Zellen. Außerdem reguliert es die Entwicklung von B-Zellen [76–78]. In Kombination mit TGF $\beta$  wurde in der Maus [79] und mit TGF $\beta$ , IL-21, IL-23, IL-1 und TNF $\alpha$  ebenfalls im Menschen eine Differenzierung von Th17 Zellen beobachtet [80]. Ein weiteres Zytokin, Interleukin 17 (IL-17), welches von entzündungsfördernden Th17 Zellen freigesetzt wird, fördert die Expression von IL-1 und TNF $\alpha$  in Monozyten sowie IL-6, IL-8, GM-CSF und MMPs in synovialen Fibroblasten [81, 82]. RANKL produzierende Th17 Zellen ermöglichen die Differenzierung und Aktivität der Osteoklasten und ermöglichen die Knochenresorption [64]. Durch die Zellen freigesetztes RANKL kann wiederum die Expression der entzündlichen Interleukine IL-6 und IL-1 sowie der wachstumsfördernden Interleukine IL-12 und IL-15 in anderen T-Zellen induzieren [83]. Die Angiogenese nimmt in der Ausbildung des Pannus (hyperplastische synoviale Membran) eine Schlüsselrolle ein, weil dessen Invasion in den Knorpel und Knochen eine erhöhte Blutzufuhr benötigt [84]. Die Neubildung von Blutgefäßen wird durch den Wachstumsfaktor VEGF maßgebend gefördert. So wurde in *in vitro* kultivierten Synoviozyten unter Zugabe von IL-6, IL-1 und TNF $\alpha$  eine vermehrte VEGF-Freisetzung nachgewiesen [85].

T-Zellen sowie Monozyten und Makrophagen produzieren IL-15, welches ebenfalls im Knochenabbau involviert ist [86]. Mäuse mit IL-15-Rezeptor-Defizienz zeigen eine erhöhte Knochendichte und eine geringere Anzahl an Osteoklasten [87]. Ein weiteres Zytokin, welches zur Osteoklastogenese beiträgt ist IL-8, das nicht nur durch Immunzellen sondern auch durch Osteoklasten selbst produziert wird [88]. Hingegen unterstützen Zytokine IL-4 und IL-3 den Knochenaufbau, indem eine IL-1-induzierte Resorption des Knochens inhibiert wird [89]. Die Resorption des Knochens kann auch durch IL-10 inhibiert werden, welches von T-Zellen, B-Zellen und Monozyten produziert wird [90, 91]. TGF $\beta$  ist ein Wachstumsfaktor, welcher sowohl anti-inflammatorische als auch inflammatorische Wirkung haben kann. Er spielt eine wichtige Rolle im Knochenabbau, Knochenaufbau sowie in der Expression von inflammatorischen Zytokinen [69, 70]. Es wird von verschiedenen Zellen freigesetzt, und zwar in drei Isoformen (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 und TGF $\beta$ 3), welchen eine Wirkung im Knochenmetabolismus zugeschrieben wird [92]. Das Wirkungsspektrum des Zytokins TGF $\beta$  ist sehr breit und hängt von der Umgebung ab, in welcher es agieren soll [69].

In Abb.1.6 ist eine Übersicht der in RA involvierten Zelltypen, die durch direkte Zell-Zell-

Kommunikation sowie Zytokinfreisetzung den Verlauf der Krankheit beeinflussen, dargestellt. Osteoblasten regulieren die Osteoklastogenese über das Verhältnis von RANKL/OPG. Doch während einer entzündlichen Erkrankung werden die Osteoblasten durch  $\text{TNF}\alpha$  inhibiert. In Studien wurde gezeigt, dass die Bestrahlung mit niedrigen Dosen den Wnt-Signalweg induzieren kann [93], welches wiederum die Differenzierung und somit das RANKL/OPG Gleichgewicht in Osteoblasten wiederherstellen könnte. Dadurch würde die Knochenresorption durch Osteoklasten abnehmen. Die Osteoklasten werden nicht nur durch Osteoblasten reguliert, sondern auch durch T-Zellen, wie z.B Th17 Zellen. Th17 Zellen produzieren lösliches RANKL, welches die Differenzierung von Osteoklasten unterstützt [94]. Neben RANKL setzen Th17 auch IL-17 frei, welches andere Immunzellen zusätzlich aktiviert [95]. Th17 Zellen differenzieren unter anderem durch IL-1 $\beta$ , dessen Freisetzung durch LD-RT Bestrahlung reduziert werden kann [96]. Als Antagonist zur Th17 gelten Treg Zellen, welche immunsuppressiv wirken. Treg Differenzierung wird durch  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{TGF}\beta$  beeinflusst. In Patienten nach Radon-Therapie wurde eine Zunahme von  $\text{TGF}\beta$  gemessen, was potentiell zur Differenzierung von Treg beitragen könnte [97].

Tabelle 1.1: Im Knochenmetabolismus relevante Zytokine. Modifiziert aus [98]

Zytokin	Wirkungsmechanismus	Synergie mit anderen inflammatorischen Zytokinen
IL-1	RANKL-Expression in Stromazellen	$\text{TNF}\alpha$ , IL-6, PGE2
$\text{TNF}\alpha$	RANKL-abhängige Osteoklastogenese	IL-1, IL-6, RANKL
IL-6	RANKL und OPG	IL-1, $\text{TNF}\alpha$ , PGE2
IL-8	RANKL	-
IL-15	Differenzierung von OC	$\text{TNF}\alpha$
IL-17	RANKL	$\text{TNF}\alpha$ , IL-1, PGE2
INFg	RANKL signaling, Cathepsin K, VitD3 und IL-1 gesteuerte Osteoklastogenese	IL-12
IL-4	NFATc1 Expression über STAT6, c-Fos Expression, OPG und RANKL	$\text{TNF}\alpha$ signaling, IL-1
IL-10	OPG und RANKL Expression	-
IL-13	OPG und RANKL via STAT6, Apoptosis von OC	-
IL-23	Th17, IL17, RANKL	IL-18l

IL-Interleukin, RANKL-receptor activator of nuclear factor  $\kappa\text{B}$  ligand,  $\text{TNF}$ - Tumornekrosefaktor, PGE-Prostaglandin, OC-Osteoklasten, INF-Interferon, VitD3-1 $\alpha$ ,25-Dihydroxycholecalciferol, NFATc1-nuclear factor of activated T-cells, STAT6-signal transducer and activator of transcription 6.

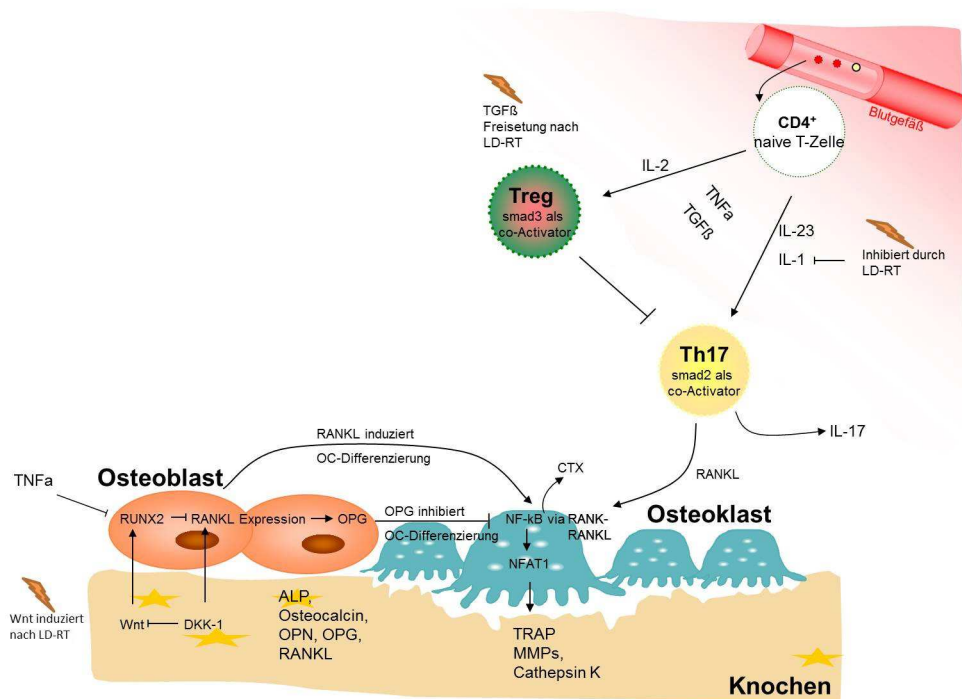


Abbildung 1.6: Einwirkung ionisierender Strahlung mit niedrigen Dosen auf die im Knochenmetabolismus relevanten Zellen.

## 1.5 Therapie muskuloskelettaler Erkrankungen

### 1.5.1 Konventionelle Basistherapie mit Medikamenten

Die Behandlung von RA basiert auf verschiedenen Prinzipien. Bei der konventionellen und medikamentösen Basistherapie, die langfristig angelegt ist, werden *disease-modifying antirheumatic drugs*, (DMARDs) sowie nicht-steroidale anti-inflammatorische Glucocorticoide (GCs) verabreicht. Dies kann kombiniert mit nichtpharmakologischen Behandlungen wie Physiotherapie zur Besserung führen, indem der weitere Krankheitsverlauf und die damit verbundenen Beschwerden teilweise eingedämmt werden. Die überwiegende Anzahl der Patienten wird mit DMARDs behandelt.

In den letzten Jahren gab es einen enormen Fortschritt in der Entwicklung neuer Biologika-Medikamente, die sich insbesondere gegen den Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), die Rezeptoren IL-1 und IL-6 sowie B- und T-Zell Stimulierung richten [55]. Zusätzlich wurde der chemische DMARD Leunomid zugelassen, der in einer Kombination mit Methotrexat (MTX) erfolgreich eingesetzt wird [99]. Ziel dieser Biologika-Medikamente ist es, die Funktion von entzündlichen Immunzellen zu unterdrücken. Zusätzlich wurden Therapieformen entwickelt, die sich gegen den TNF $\alpha$  richten, da seine Wichtigkeit in der Pathogenese der entzündlichen Erkrankungen und der darauffolgenden Auslösung des Knochenschwundes in unterschiedliche Studien gezeigt

wurde. Im Laufe der Jahre wurden verschiedene anti-TNF Antikörper (Iniximab, Adalimumab) und Fusionsproteine aus TNF-Rezeptor mit Fc-Untereinheit (Etanercept) entwickelt [100, 101]. Im Vergleich zum natürlich vorkommenden TNF-Rezeptor weist Etanercept eine längere Stabilität und somit eine bessere Wirkung gegenüber  $\text{TNF}\alpha$  auf. Die Inhibierung von TNF führt nicht nur zur Minderung der klinischen Symptome der Entzündung sondern gleichzeitig auch zur Suppression der entzündlich bedingten Knochenschäden [102, 103]. Es wurde gezeigt, dass eine Verabreichung von TNF-Inhibitoren zur direkten Apoptose in Monozyten und T-Zellen führt [104, 105].

Neben  $\text{TNF}\alpha$  steht auch  $\text{IL-1}\beta$  im Fokus der Medikamentenentwicklung.  $\text{IL-1}\beta$  induziert die RANKL-Expression und unterstützt somit die Osteoklastogenese. Anakinra ist ein  $\text{IL-1}$ -Rezeptorantagonist, welcher  $\text{IL-1}\beta$  bindet und in Kombination mit MTX verabreicht eine Besserung der Symptome um bis zu 20% in Vergleich zur reinen MTX-Behandlung erreichen kann [106].

Ein weiterer Angriffspunkt für eine erfolgreiche Therapie bietet das Interleukin 6.  $\text{IL-6}$  ist ein wichtiger Mediator in der Induktion von C-reaktivem Protein (CRP) und anderen entzündlichen Erkrankungen und dessen Überexpression führt zur Osteopenia- einer Abnahme der Knochendichte und Veränderungen der Knochenstruktur [107]. Der entwickelte Antikörper Tocilizumab wird alleine oder in der Kombination mit MTX angewendet und erreicht bei 30% der Patienten eine Remission [108]. Für  $\text{IL-17}$ , welches von entzündlichen Th17 Zellen gebildet wird und am Verlauf der Erkrankung involviert ist, wurde ebenfalls ein Antikörper entwickelt, welcher sich noch in der klinischen Phase (IIIb) befindet (Secukinumab, AIN457, NOVARTIS).

Nach dem Entdecken der RANKL-OPG-Achse im Knochenmetabolismus und der zentralen Rolle von RANKL in der Osteoklastogenese wurden Studien zur Inhibierung von RANKL durchgeführt. Als eines der erfolgsversprechenden Medikamente hat sich Denosumab, ein anti-RANKL Antikörper, herausgestellt. Denosumab reduziert den lokalen Abbau des Knochens, hat jedoch keine signifikante Auswirkung auf den Verlauf und die Schwere der Erkrankung [109]. Da die Aktivität von Osteoklasten in der RA maßgeblich zur Verschlechterung der Symptome beiträgt, welche zur Beweglichkeitseinschränkungen bei Patienten führt, wird die Aktivität der Osteoklasten mittels Bisphosphonaten inhibiert. Bisphosphonate sind synthetische, nicht hydrolysierbare Analoga des anorganischen Pyrophosphonates. Aufgrund deren Molekülstruktur ist es ihnen möglich  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen zu binden, insbesondere an Stellen mit erhöhter Knochenresorption. Die erste Generation der Bisphosphonate (Etidronat, Clodronat, Tiludronat) wird in nicht hydrolysierbares ATP umgewandelt und akkumuliert intrazellulär. Dies führt zur Apoptose, da Osteoklasten keine ATP-abhängigen Reaktionen mehr steuern können. Die zweite Gruppe der Bisphosphonate enthält eine Aminogruppe (Pamidronat, Alendronat) und inhibiert die Farnesylpyrophosphat-Synthase, ein Enzym der Mevalonsäurestoffwechsels. Durch die Inhibition können die Produkte dieses Enzyms, Farnesyl- und Geranylpyrophosphat kleine G-Proteine (u.a. Ras) nicht mehr in der Zellmembran verankern. Als Konsequenz folgen zytoskelettale Veränderungen und die Differenzierung von Osteoklasten wird inhibiert [110]. Die Medikamente verfügen nicht nur über positive Wirkungsmechanismen, sondern besitzen auch Nebenwirkungen. Die Nebenwirkungen sind in der Tabelle 1.2 aufgeführt.

Tabelle 1.2: Medikamente in RA und ihre Nebenwirkungen.

Medikament	Wirkungsmechanismus	Nebenwirkungen
Infliximab, Adalimumab, Etanercept	TNF $\alpha$	allergischen Kreislaufreaktionen, Hautreaktionen, Juckreiz, Schwierigkeiten beim Atmen oder Schlucken, Doppeltsehen oder Muskelschwäche
Anakinra	IL-1	Kopfschmerzen, schwerwiegende Infektionen, allergische Reaktionen
Tocilizumab	IL-6	Infektionen der Atemwege, Ma- genschleimhautentzündungen, Kopfschmerzen, Bluthochdruck
Denosumab	RANKL	Harnwegsinfektionen, obere Atemwegsinfektionen, grauer Star, Verstopfung, Ausschlag, Hautinfektionen, Hyperkalzämie
Bisphosphonate	Differenzierung von OC	Übelkeit, Bauchschmerzen, Erbrechen und Durchfall, Knochennekrosen

### 1.5.2 Niedrig-Dosis-Strahlentherapie

Zur Behandlung von entzündeten Gelenken besteht neben einer konventionellen Medikamententherapie auch die Möglichkeit der Anwendung von ionisierender Strahlung. Dabei wird die Strahlung in niedrigen Dosen (Low-dose Radiotherapy, LD-RT) entweder lokal im Falle einer Photonenstrahlung oder ganzkörperlich bei Radongasbehandlung verabreicht. Die LD-RT ist effektiv, kostengünstig und aufgrund der geringen Nebenwirkungen stellt sie eine gute Alternative zur medikamentösen Therapie dar.

Die Bestrahlung mit Photonen wird in Fraktionen von 0.5 Gy mit einer Gesamtdosis von insgesamt 6 Gy appliziert. Diese Werte basieren auf klinisch-empirischen Untersuchungen von Pannewitz in 1933, 1970. Bis heute wurden mehrere Tausend Patienten bereits erfolgreich mit LD-RT behandelt (37,410 Patienten/Jahr) [111]. Den überwiegenden Anteil von 63.5% stellen Patienten mit degenerativen Erkrankungen dar.

Trotz großer Erfahrung in der Anwendung von LD-RT sind die molekularen und zellulären Grundlagen nur wenig erforscht. Aus diesem Grund wurden in den vergangenen Jahren vermehrt die Effekte von Niedrigdosis-Strahlung in der Zellkultur oder in Mausmodellen untersucht. So wurde in arthritischen Tiermodellen anti-inflammatorische Effekte nach Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von 2.5-7.5 Gy Röntgenstrahlung nachgewiesen [112–116]. Klinisch und histomorphologisch wurde eine Minderung der Entzündung sowie eine geringere Knochenerosion im Maus-Modell festgestellt, welche mit einem Rückgang der Makrophagen-Population einherging [117]. Auch eine fraktionierte Strahlung mit nur einer geringen Dosis von 0.5 Gy in arthritischen Mäusen führte zur Suppression der Produktion von IL-17 und IL-6 sowie einem Anstieg der anti-entzündlichen Tregs [118]. In Mausmodellen mit multipler Sklerose (MS),



einer chronisch-entzündliche Erkrankung der Myelinscheiden im zentralen Nervensystem, wurde nach fraktionierter Behandlung mit 0.5 Gy (4x wöchentlich) eine Suppression der CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie ein Anstieg der regulatorischen T-Zellen gemessen [119]. Eine mögliche Erklärung für die Entzündungslinderung könnte im Allgemeinen darauf beruhen, dass unter anderem durch die Strahleneinwirkung die Produktion von NO (Stickstoffoxid) durch Makrophagen herabreguliert wird und somit die Entzündungsvorgänge herunterreguliert [120]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion der Leukozyten an Endothelzellen bei der Transmigration ins Gewebe durch Bestrahlung gestört wird [121]. Neben der direkten Wirkung von Strahlung auf die Zellen des Immunsystems wurde auch der Einfluss auf die Signalwege zwischen den Zellen untersucht. Die mögliche Einwirkung von LD-RT auf die im Knochenmetabolismus relevanten Zellen (OB, OC, T-Zellen) sind in Abbildung 1.6 dargestellt. Die Faktoren wie NF- $\kappa$ B oder AP-1 werden durch die Bestrahlung aktiviert und führen zur Translationen wichtiger anti-inflammatorischer Zytokine wie z.B. TGF- $\beta$  [122, 123]. In Studien wurde gezeigt, dass LD-RT zu immunsuppressiven Effekten führt, welche zur beschleunigten Differenzierung der Knochenmarkprogenitoren [124] sowie Abnahme der Leukozytenzahl im Blut führt [125, 126].

Zusätzlich zur Photonen LD-RT kann Radon in Rahmen einer Balneotherapie oder Ganzkörperexposition in Bergstollen angewendet werden. **Radon** (<sup>222</sup>Rn) ist ein radioaktives Edelgas und entsteht durch den Zerfall von Radium (<sup>226</sup>Ra) mit einer Halbwertszeit von 3,8 Tagen. Beim Zerfall von Radium und Radon werden  $\alpha$ -Teilchen freigesetzt. Sie haben eine Reichweite in Wasser von 41,1  $\mu$ m und 20  $\mu$ m in Gewebe. Die Zeit in der Radon im Körper verbleibt wird auf wenige Minuten geschätzt, während ungefähr 60% des inkorporierten Radons innerhalb von 15-30 min ausgeatmet wird [127].

Der weitere Zerfall von Radon führt zu kurzlebigen, radioaktiven Tochterprodukten wie Blei und Polonium unter Freisetzung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Partikeln. Die meiste  $\alpha$ - und  $\beta$ -Strahlung wird innerhalb der ersten 7 Stunden emittiert, die restliche schwache  $\beta$ -Strahlung kommt von Blei und Bismut mit einer Halbwertszeit von 23 Jahren [128, 129]. In den Stollen hängt die Radonkonzentration in der Luft von den geologischen Beschaffenheiten des Bodens ab. So wird in granitischen und vulkanischen Landstrichen eine höhere Konzentration gemessen als in Schotter- oder Muschelkalkgebieten. Die bei der klinischen Anwendung von Radon relevanten Dosen konnten bisher nur geschätzt werden. Basierend auf Aktivitätsmessungen im Radonstollen (mittlere Aktivität: 43 kBq/m<sup>3</sup>) und in Wannenbädern beträgt die mittlere Dosis während einer Kur mit insgesamt 10 Anwendungen für die Epidermis ca. 2 mGy. Die mittlere Dosis für das gesamte Hautgewebe liegt bei 30  $\mu$ Gy und die Dosen in den übrigen Organen ebenfalls bei wenigen  $\mu$ Gy. Es muss demnach davon ausgegangen werden, dass die applizierten Dosen sehr gering sind. Die genaue Wirkung von Radon wird in randomisierten Studien in Patienten seit 1990 untersucht. Die Studien berichten über eine Minderung der krankheitsspezifischen Symptome [130–132]. Untersuchungen *in vivo* zeigten, dass Radon vermehrt in der Haut inkorporiert wird und die Sekretion von Kortikoiden der Nebennierenrinde stimuliert [133]. Auch die Aktivität der natürlichen Killerzellen, welche bei RA Erkrankung vermindert ist, wurde nach Radon Behandlung normalisiert [134]. Neuere Studien [97] deuten auf Veränderung des Zytokinmilieus hin, welches die Entzündung und den Knochenabbau

unterdrückt.

## 1.6 Physikalische Grundlagen ionisierender Strahlung

Sowohl Photonen als auch die durch Radon freigesetzten  $\alpha$ -Teilchen gehören zur Gruppe ionisierender Strahlung. Demgegenüber gibt es auch nicht ionisierende Strahlenarten wie z.B. die Infrarotstrahlung. Im Falle von ionisierender Strahlung können Photonen bzw. Korpuskeln mit Materie Wechselwirkungen eingehen und mittels zur Verfügung stehender Energie Ionisationen auslösen. Dabei wird ein Elektron aus einem Atom entfernt [135].

Die von der Strahlung deponierte Energie  $\Delta E_{\text{abs}}$  pro Masseneinheit  $\Delta m$  wird als Dosis  $D$  angegeben und ist eine wichtige physikalische Größe, da biologische Effekte von ionisierender Strahlung häufig als Funktion der Dosis beschrieben werden können :

$$D = \frac{\Delta E_{\text{abs}}}{\Delta m} \left[ \text{Gy} = \frac{\text{J}}{\text{kg}} \right] \quad (1.1)$$

Ionisierende Strahlung kann wiederum in Wellenstrahlung und Teilchenstrahlung eingeteilt werden. Zur Wellenstrahlung zählen die elektromagnetischen Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlen. Photonen übertragen ihre Energie auf die Wechselwirkungspartner in diskreter Form. Die gebündelte Energie eines Photons ist abhängig von Frequenz  $\nu$  und Plancksches Wirkungsquantum  $h$ . Die Frequenz  $\nu$  wird aus Wellenlänge  $\lambda$  und Lichtgeschwindigkeit  $c$  bestimmt:

$$E = h\nu, \text{ mit } \nu = \frac{c}{\lambda} \quad (1.2)$$

Teilchenstrahlung unterteilt sich in geladene Ionen (z.B. Protonen,  $\alpha$ -Partikel und Schwerionen), Elektronen und ungeladene Neutronen (Hall.2012). Die geladenen Teilchen können durch ihr elektrisches Feld direkt Elektronen aus der Atomhülle schlagen und so Ionen zurücklassen. Dieser Vorgang wird als direkte Ionisation bezeichnet. Zu einer indirekten Ionisation zählen alle Strahlungsarten ohne elektrische Ladung (Photonen, Neutronen), die ihre Energie zunächst auf ein anderes Atom übertragen, welches seinerseits die umgebende Materie ionisieren kann [136].

Zudem wird zwischen dünn- und dicht ionisierender Strahlung unterschieden. Elektronen und die Sekundärelektronen produzierende Photonenstrahlung zählt wegen ihres geringen Ionisierungsvermögens zu den dünn ionisierenden Strahlungsarten. Bei dünn ionisierender Strahlung sind Ionisationsereignisse gleichmäßig über das gesamte Bestrahlungsvolumen verteilt.  $\alpha$ -Teilchen oder Schwerionen erzeugen dicht ionisierende Strahlung, da die Ionisationsereignisse in kleinen kompakten Volumina um die Bahnspur des Teilchen erfolgen [136] (siehe Abb.1.7).

### 1.6.1 Dosisdeposition dünn ionisierender Strahlung

Photonenstrahlen ionisieren die Atome der Zielmaterie über Photoeffekt, Comptoneffekt oder über Paarbildung. Dabei wird die Energie von Photonen auf Elektronen übertragen mit einer zufälligen Raumverteilung. Durch die Ionisation erzeugte freie Elektronen geben ihre Energie durch Interaktion mit anderen Elektronen weiter ab und führt so zur einer



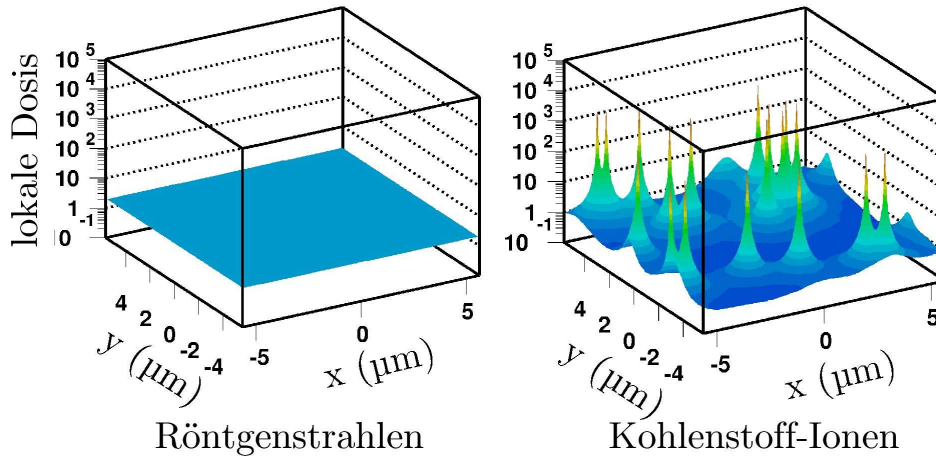


Abbildung 1.7: Dosisverteilung in dünn und dicht-ionisierender Strahlung. Röntgenstrahlen deponieren ihre Energie homogen über die bestrahlte Fläche. Teilchenstrahlung (Kohlenstoff-Ionen) deponiert ihre Energie entlang der Teilchenspur. Dargestellt die Dosisverteilung bei Bestrahlung mit 2 Gy auf der Fläche eines typischen Fibroblastenkernes [137]

homogenen Energieverteilung (siehe Abb.1.7) Die mittlere freie Weglänge zwischen diesen sekundären Ionisationsereignissen sinkt mit der Energie der beteiligten Elektronen. Wie in Abb.1.8 dargestellt, nimmt die Energiedeposition mit steigender Eindringtiefe exponentiell ab.

### 1.6.2 Dosisdeposition dicht ionisierender Strahlung

Dicht ionisierende Teilchen erzeugen ebenso wie Photonenstrahlen Sekundärelektronen, jedoch ist die Energiedeposition deutlich höher, da der überwiegende Anteil der Ionisationsereignisse unweit von der Teilchenspur erzeugt wird. Die erzeugten Elektronen besitzen eine niedrige Energie und können sich nicht weit entfernen.

Die Reichweite des Elektrons steigt mit seiner Energie an, so dass die Energiedeposition mit dem Quadrat des Abstandes zum Ion abnimmt. Es führt zu einer extrem hohen lokalen Dosisdeposition entlang der Teilchenspur (siehe Abb.1.7) Da sich das Ionisationsvermögen nur schwer meßtechnisch ermitteln lässt, wird zur Charakterisierung einer Strahlung der Quotient aus dem mittleren Energieverlust ( $dE$ ), den das Teilchen durch Stöße erleidet und dem dabei zurückgelegten Weg ( $ds$ ) verwendet und als linearer Energietransfer (LET) bezeichnet :

$$\text{LET} = \frac{dE}{ds} \left[ \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}} \right] \quad (1.3)$$

Dünn ionisierende Strahlung hat einen LET weniger als 3,5 keV/μm, während dicht ionisierende Strahlenarten höhere LET Werte aufweisen.

Während in der LD-RT Photonenstrahlung angewendet wird, können zur Behandlung von entzündlichen Erkrankungen  $\alpha$ -Partikel in Rahmen einer Radontherapie angewendet werden. Wie in Abb.1.9 dargestellt, zerfällt Radium (Ra-226) in Radon (Rn-222) unter Emitierung eines  $\alpha$ -Teilchens, dabei wird die Ordnungszahl um 2 und die Kernmasse um 4 reduziert.

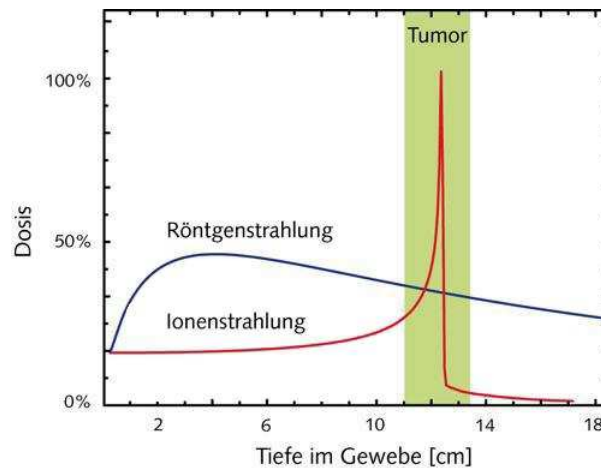


Abbildung 1.8: Energiedeposition von Röntgenstrahlen und Kohlenstoff-Ionen in Abhängigkeit ihrer Eindringtiefe in Wasser. Bei Röntgenstrahlung sinkt die Dosis mit der Eindringtiefe exponentiell. Bei Kohlenstoff-Ionen steigt die Energiedeposition mit der Eindringtiefe an und fällt nach Erreichen der maximalen Eindringtiefe stark ab.

Ein  $\alpha$ -Teilchen ist ein doppelt ionisiertes  $4\text{He}$ -Atom. Das  $\alpha$ -Teilchen, das aus dem Grundzustandszerfall herrührt, hat eine Energie von 4,782 MeV und besitzen eine relativ geringe Reichweite. Aufgrund der hohen LET sind  $\alpha$ -Teilchen im Vergleich zu Photonenstrahlung besonders effektiv und in der Wirksamkeit mit Kohlenstoff-Ionen vergleichbar.

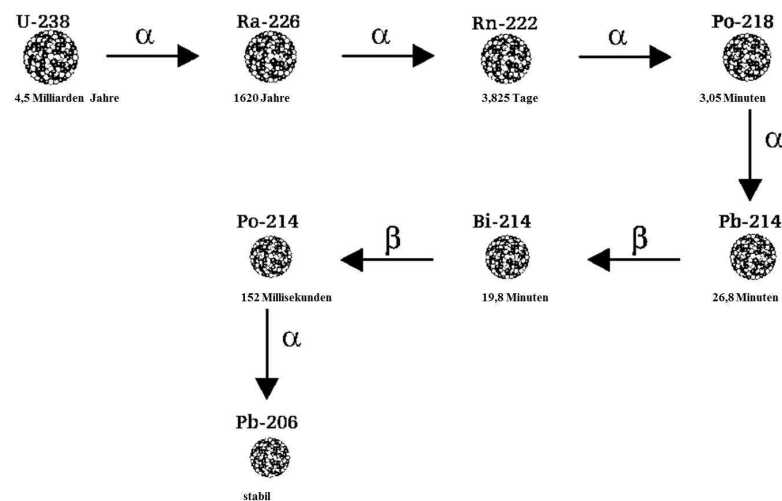


Abbildung 1.9: Zerfallsreihe von Radium-226. Modifiziert von Sächsisches Staatsministerium für Umwelt und Landwirtschaft

## 1.7 Strahlenbiologische Veränderungen

Bei einer Wechselwirkung zwischen biologischem Material (Zellen, Gewebe) und Strahlung, kann es zu biochemischen und biologischen Veränderungen kommen. Biochemische Wirkungen sind dann zu erwarten, wenn die Energieübertragung zur Ionisation oder zu Struktur verändernden Anregungen von Biomolekülen führt. Der Energiebedarf für eine solche Ionisation liegt bei 15 eV. Ionisierende Strahlung kann zu DNA-Brüchen führen, welche zu Veränderungen in der Zellzyklusverteilung, veränderter Proteinexpression oder gar Apoptose führen können.

### 1.7.1 Zellzyklusänderungen

Die Zellen durchlaufen einen Zellzyklus. Sie wachsen und teilen sich am Ende in zwei Tochterzellen. Der Zellzyklus wird in 4 Phasen unterteilt- Mitose, G1, S und G2. Die Länge des Zellzyklus variiert zwischen den einzelnen Zelltypen.

Zellen durchlaufen während der Zellzyklusphasen bestimmte Kontrollpunkte (Checkpoints), an denen geprüft wird, ob Schäden auftreten und die Zellzyklusprogression weiter fortgeführt werden kann. Falls die Zelle die Bedingungen nicht erfüllt, kommt es zu einem Zellzyklus-Arrest in der jeweiligen Phase. Die Progression des Zellzyklus wird zum großen Teil durch die Aktivität von Cyclin-abhängigen Kinasen reguliert.

Bestrahlung kann zu einem Arrest in G2 oder anderen Zellzyklusphasen führen. In der G2-Phase sind die Zellen besonders strahlensensitiv und können aufgrund einer fehlerhaften Reparatur die Schäden auf die nächste Zellgeneration übertragen. Die Akkumulation der Schäden führt dann letztendlich zum Zelltod.

### 1.7.2 Differenzierung

Als Differenzierung bezeichnet man die Entwicklung von Zellen ausgehend von einem weniger spezialisierten Zustand und Übergang in einen stärker spezialisierten Zustand. Während des Differenzierungsprozesses durchlaufen die Zellen mehrfach Zellteilungen, welche zum Erreichen eines bestimmten Differenzierungsgrades notwendig sind. Eine beschleunigte Differenzierung verringert die Anzahl der Zellteilungen.

Eine Bestrahlung kann zu einer beschleunigten Differenzierung führen. Hierbei können strahleninduzierte genetische Veränderungen dazu führen, dass der Eintritt in die nächste Mitose fehlschlägt oder sie durchlaufen einige Zellteilungen unter geringer Wachstumsrate [138]. Somit führt der verlangsamte Zellzyklus oder das Fehlen bestimmter Faktoren nach Bestrahlung die Zellen zu einer schnelleren Differenzierung. *In vitro* Beobachtungen zeigten bereits in mehreren Zelltypen wie Plattenepithelkarzinom, Darmepithel, Neuroblastomzellen sowie Fibroblasten, dass eine beschleunigte Differenzierung nach Bestrahlung eintritt [139–142].

### 1.7.3 Apoptose

Apoptose ist ein sehr straff programmierter und regulierter Zelltod, welcher eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Homöostase von Normalgewebe spielt. Mittels Apoptose werden

nicht mehr benötigte oder geschädigte Zellen aus dem Pool der gesunden Zellen eliminiert und somit eine gesunde Balance aufrechterhalten. Eine Störung im Ablauf der Apoptose kann auch Ursache für Krankheiten sein. So kann ein fehlerhafter Verlauf in der Apoptose zu Krebs oder Autoimmunerkrankungen führen, während eine verstärkte Apoptose mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson assoziiert wird [143].

Der intrinsische Signalweg wird durch vielfältige intrazelluläre Stressfaktoren wie z.B. DNA-Schäden ausgelöst, welche zur Permeabilisierung der mitochondrialen Membran führt [144]. Die Zerstörung der Membran führt zur Freisetzung von Faktoren wie Cytochrom C oder SMAC sowie Endonuklease G und AIF ins Zytosol, welche dann wiederum Caspasen aktivieren. Caspasen spalten proteolytisch verschiedene intrazelluläre Substrate und zerstören dabei die Zellphysiologie. Dies führt zu phänotypischen Veränderungen, welche für eine apoptotische Zelle charakteristisch sind [145]. Die Zelle beginnt als Folge der Spaltung von Aktin- und Lamin-Filamenten des Zytoskeletts zu schrumpfen. Das Endstadium einer Apoptose ist durch die Bildung der Membranbläschen oder Vesikeln (*apoptotic bodies*) gekennzeichnet. Die Zelle verändert ihre Form in der Art und Weise, präsentiert auf ihrer Membran Phosphatidylserine damit sie durch Makrophagen phagozytiert werden kann. Makrophagen sind für die saubere Entfernung der toten Zellen verantwortlich

## 1.8 Problemstellung

Störungen des Knochenmetabolismus können zu entzündlichen Erkrankungen wie Rheumatoider Arthritis (RA) führen. Dabei ist die fein regulierte Balance zwischen Knochenaufbau und Knochenabbau gestört. Zur Behandlung der Erkrankung werden neben konventionellen Basistherapien auch Strahlentherapien, in Form von Photonenbestrahlung mit niedrigen Dosen (LD-RT) oder  $\alpha$ -Teilchen in Radon-Bädern angewendet. Eine Bestrahlung kann zu einer deutlichen Minderung der Krankheitssymptome führen. Trotz des klinischen Erfolgs sind die molekularen und zellulären Mechanismen der Bestrahlung weitgehend ungeklärt. Zur besseren Planung der Therapie sowie einer Risikoabschätzung der Strahlung sind weitere Untersuchungen und Erkenntnisse notwendig.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Auswirkung von niedrigen Dosen ionisierender Strahlung auf Zellen, welche am Knochenmetabolismus beteiligt sind, untersucht. Da zudem das Immunsystem maßgeblich an der Regulation des Knochenmetabolismus beteiligt ist, wurden neben den knochenaufbauenden Osteoblasten und knochenabbauenden Osteoklasten ebenfalls T-Zellen untersucht. Da in diesen Zelltypen eine Bestrahlung zu Veränderungen in der Differenzierung und zur Freisetzung von Zytokinen sowie einer möglichen strahlen-induzierte Apoptose führen könnte, wurden diese Aspekte untersucht.

Im Fokus der Untersuchungen stand eine mögliche strahleninduzierte Differenzierung der Osteoblasten, die mittels geeigneter Differenzierungsmarker untersucht wurde. Dabei sollte die Eigenschaft der Zellen zur Mineralisierung der Matrixumgebung nach Bestrahlung untersucht werden, sowie die Expression von Transkriptionsfaktoren nach Bestrahlung bestimmt werden. Zwar liegen hier einigen Untersuchungen zum Verhalten der Osteoblasten nach Bestrahlung mit

hohen Dosen Röntgenstrahlung vor, die Ergebnisse zur Behandlung der Zellen mit niedrigen Dosen sind unvollständig oder gar nicht vorhanden. Diese Lücke sollte mit Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit geschlossen werden.

Die Entwicklung von knochenabbauenden Osteoklasten ist eng an die Differenzierung von Osteoblasten gekoppelt. Daher war es sinnvoll auch die Differenzierung dieser Zellen nach Bestrahlung zu untersuchen. Da Monozyten als Vorläufer von Osteoklasten fungieren, wurde aufgrund deren Strahlensensitivität [146] eine erhöhte Apoptoserate sowie ein Differenzierungsstop nach Bestrahlung vermutet. In ersten Experimenten sollte daher die Proliferation und Differenzierung der Osteoklastenvorläuferzellen nach Bestrahlung untersucht werden. Dabei ist nicht nur die Ausbildung von multinukleären Zellen wichtig, sondern auch die Expression der differenzierungsspezifischen sowie aktivitätsbestimmenden Proteine. In den *in vitro* Untersuchungen wurde ebenfalls die Funktionalität der Zellen nach Bestrahlung auf Plastik und anderen Substraten etabliert.

Neben der Untersuchung zur Kommunikation zwischen Osteoblasten und Osteoklasten sollte der Einfluss von entzündlichen Th17 Zellen sowie deren Antagonisten Treg Zellen untersucht werden. Treg gelten als strahlenresistent [147], so dass die Hypothese untersucht werden sollte, ob die Aktivität von entzündlichen Th17 Zellen durch eine erhöhte Differenzierung von Treg Zellen nach Bestrahlung inhibiert werden könnte.

Für die Untersuchungen benötigte Zellen sollten aus primären humanen Vorläuferzellen differenziert werden.

Neben den *in vitro* Untersuchungen sollten im Rahmen der RADON Studie Serien von Patienten mit muskuloskelettalen Erkrankungen auf Marker des Knochenumbaus sowie das Verhältnis von Th17/Treg untersucht werden. Die bisherigen Studien [97, 148] zeigten einen anti-inflammatorischen Effekt, welcher unter anderem auf den Rückgang der  $\text{TNF}\alpha$  sowie eine Zunahme von  $\text{TGF}\beta$  beruht. Da diese Zytokine in der Differenzierung von Th17 und Treg eine Rolle spielen, wurde eine Verschiebung des Th17:Treg Verhältnisses vermutet, das ebenfalls eine inhibierende Wirkung auf die Osteoklastogenese haben und somit den Knochenabbau vermindern könnte.

Insgesamt sollten die Untersuchungen dieser Arbeit zur Aufklärung der Auswirkung von LD-Röntgenstrahlung und Radonexposition auf mechanistische Abläufe im Knochenmetabolismus beitragen.



# Kapitel 2

## Methoden

### 2.1 Zellen und Kultivierungsbedingungen

In diesem Abschnitt sind Methoden beschrieben, die für die Erstellung der vorliegenden Arbeit angewendet wurden. Die Informationen zu verwendeten Materialien, Chemikalien und Lösungen sind im Anhang aufgelistet.

Wie in der Abb.2.1 dargestellt, wurden alle verwendeten Zellen aus humanem Material (Blut, Buffycoat, Knochenmark) gewonnen und entsprechend der beschriebenen Methoden kultiviert. Die Bereitstellung der Proben erfolgte direkt durch den Blutspendedienst oder im Rahmen der hämatopoetischen Stammzelltransplantation mit Einwilligung der Stammzellspender am Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie in Frankfurt/Main (Deutsches Rotes Kreuz, Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen).

#### 2.1.1 Isolierung humaner Lymphozyten aus peripheren Blut

Die peripheren Blutlymphozyten (PBLs) wurden aus dem Buffycoat (Deutsches Rotes Kreuz, Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen, Frankfurt am Main) isoliert. Dazu wurde das aufkonzentrierte Blut zunächst mit einer PBS/EDTA-Lösung im Verhältnis von 1:1 in einem 50 ml-Falcon Röhrchen gemischt. Zum Auftrennen der einzelnen Zellphasen des Blutes wurde eine Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll durchgeführt. In einem 50 ml-Falcon Röhrchen wurde das Blut-PBS/EDTA Gemisch vorsichtig auf die Ficoll-Phase geschichtet. Mit dem ersten Zentrifugationsschritt (1300 xg, 35 min) wurden die mononuklearen Zellen (MNCs) dauerhaft von den Granulozyten und Erythrozyten abgetrennt. Die über den MNCs entstandene Plasmaschicht wurde entweder verworfen oder für Zytokinbestimmungen aufbewahrt. Die Interphase mit MNCs wurde vorsichtig mit einer Pipette entnommen und in ein neues Röhrchen überführt. Es folgten weitere Waschschrte der MNCs mit PBS/EDTA-Lösung (680 xg, 10 min; 200 xg, 10 min). Das entstandene Zellpellet wurde im Anschluss mit Monozyten-Medium resuspendiert und in einer Zellkulturflasche inkubiert (1 Stunde bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Dies führte dazu, dass Monozyten durch Plastikadhärenz von den restlichen Lymphozyten sich abtrennten. Nach Absetzen der Monozyten wurde die Zellzahl von Lymphozyten im Überstand gemessen. Die Lymphozyten wurden anschließend in Lymphozyten-Medium zur

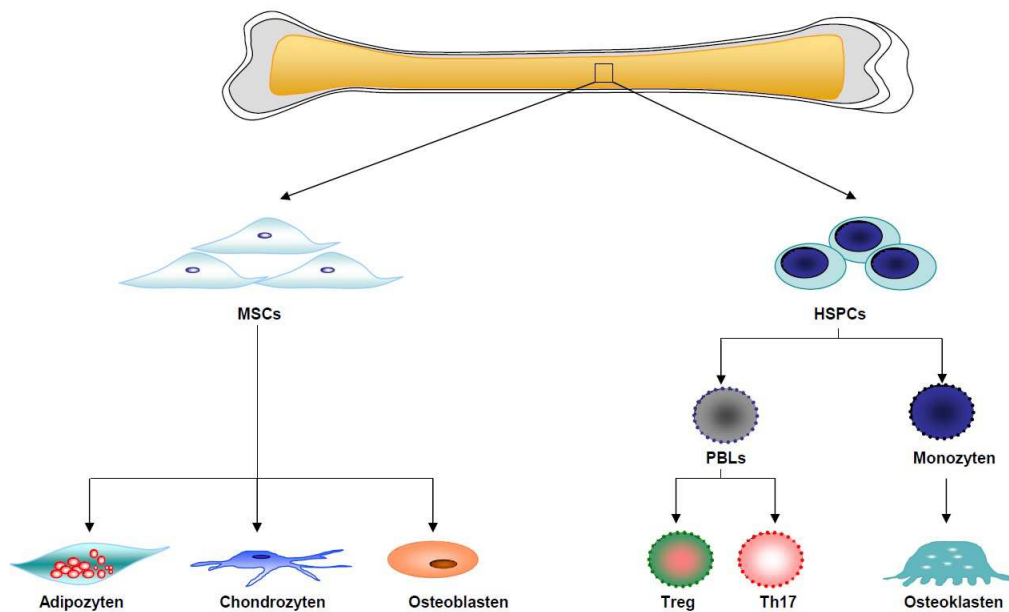


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Abstammung von verwendeten Zellen. Die Zellen wurden aus Blut oder Knochenmark isoliert. Die Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten wurden aus mesenchymalen Stammzellen (MSCs) differenziert. Die Immunzellen Th17 und Treg wurden aus  $CD4^+$  Blutlymphozyten isoliert, Osteoklasten wurden aus Monozyten differenziert. Sowohl PBLs als auch Monozyten stammen ursprünglich von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen.

weiteren Kultivierung überführt.

### 2.1.2 Anreicherung der $CD4^+$ T-Zellen

Die Isolierung der  $CD4^+$  Blutlymphozyten erfolgte mittels Immunmagnetseparation. Die aufgereinigten Lymphozyten (siehe 2.1.1) wurden mit einem Antikörper positiv markiert, der an das Epitop des Oberflächenmarkers CD4 bindet. Die Immunmagnetseparation erfolgte nach Angaben der Hersteller (CD4 Microbeads, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach). Eine definierte Lymphozyten-Zellzahl wurde in einem Röhrchen zentrifugiert (300 xg, 10min) und das Zellpellet wurde in 80  $\mu$ l FcR-Blocking Puffer pro  $10^7$  Zellen gelöst, um unspezifische Bindungen mit dem Fc-Rezeptor zu vermeiden. Die Zellsuspension wurde mit  $CD4^+$  Antikörpern, welche an MACS Microbeads angelagert sind, resuspendiert (20  $\mu$ l pro  $10^7$  Zellen für 15 min, 4 °C). Anschließend wurde die Zellsuspension mit 2 ml Säulenpuffer gewaschen (300 xg, 10 min), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 500  $\mu$ l Säulenpuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf magnetische Säulen (LD Columns, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) geladen. Durch Anhaften der  $CD4^+$  markierten Zellen an der Säule wurden diese zurückgehalten, während durch mehrmaliges Waschen mit jeweils 3 ml Säulenpuffer ein Durchfluss der  $CD4^-$



Zellen erfolgte. Nach dem Entfernen der Säulen aus dem Magnetfeld, konnten die CD4<sup>+</sup> Zellen mit 5 ml Säulenpuffer eluiert werden. Die Reinheit der isolierten Zellen wurde im Durchflusszytometer mit anti-CD4 (FITC) Antikörpern bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.8).

### 2.1.3 Differenzierung von Th17/Treg-Zellen aus CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Die Differenzierung der Lymphozyten zu IL17<sup>+</sup> (Th17) sowie Foxp3<sup>+</sup> (Treg) Zellen erfolgte in 96 Well-Platten, welche mit 5 µg/ml anti-CD3 (OKT3, ebioscience Inc, San Diego) beschichtet wurden (über Nacht bei 4°C). Der anti-CD3 Antikörper stimuliert die Lymphozyten über eine Aktivierung des TCR-Komplexes. Die CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten (siehe 2.1.2) wurden im T-Zell-Differenzierungsmedium resuspendiert, ggf. bestrahlt und anschließend 1x 10<sup>6</sup> Zellen pro Well pipettiert. Je nach Experiment wurden dem Differenzierungsmedium zusätzlich TGFβ (1ng/ml) und/oder TNFα (1ng/ml) zugegeben. Nach 7 Tagen Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) wurden die Zellen mit anti-IL17 und anti-Foxp3 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

### 2.1.4 Differenzierung von Osteoklasten

Für die Differenzierung der humanen Osteoklasten aus monozytären Vorläuferzellen wurden die angehefteten Monozyten aus einem Buffycoat (2.1.2) verwendet. Dafür wurden Monozyten zunächst von Lymphozyten im X-vivo 15 (Lonza) Medium durch das Absetzen für eine Stunde selektioniert. Anschließend wurden die adhärenenten Monozyten mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen, um die restlichen Lymphozyten zu entfernen. Den Monozyten wurde Differenzierungsmedium für Osteoklasten zugegeben und dieses alle drei Tage gewechselt. Für die Bestrahlungsexperimente wurden die Monozyten sofort nach Zugabe des Differenzierungsmediums bestrahlt.

Für die Kultivierung der Zellen auf den Knochenplättchen, wurde das Knochenplättchen für 2 Stunden im α-MEM Medium inkubiert und anschließend im autologen Serum der jeweiligen Spender im Brutschrank für 2 Stunden inkubiert. Danach wurden 200 000 PBMCs auf die vorbehandelten Knochenplättchen ausgesät. Nach 1 Stunde wurden die nicht adhärenenten Zellen verworfen und das Differenzierungsmedium auf die Knochen gegeben.

Der Nachweis von ausdifferenzierte Osteoklasten erfolgte mittels TRAP und F-Actin-Färbung (siehe Abschnitt 2.2.6.)

### 2.1.5 Isolierung humaner mesenchymaler Stammzellen aus Knochenmarkaspiraten

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs) wurden aus den Proben der Knochenmarkspunktion gesunder Spender isoliert. Die Bereitstellung der Proben erfolgte im Rahmen der hämatopoetischen Stammzelltransplantation mit Einwilligung der Stammzellspender am Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie in Frankfurt/Main (Deutsches Rotes Kreuz, Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen).

Die Proben wurden in PBS/EDTA Puffer aufgenommen und zentrifugiert (200 xg, 8 min). Anschließend erfolgte die Lyse der Erythrozyten mit RBC-Lysepuffer. Die Lyse wurde durch

Zugabe von Medium nach 5 min gestoppt. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert (200 xg, 8 min) und im MSC-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für die Kultivierung in T75cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen überführt. Nach 2 Tagen Kultivierung im Brutschrank wurde der Überstand entnommen, im Verhältnis 1:2 mit frischem Medium versetzt und in eine neue Kulturflasche überführt. Die Flasche mit bereits abgesetzten Zellen wurde mit neuem Medium gefüllt. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert unter regelmäßigem Wechsel des Mediums. Beim Erreichen der Konfluenz wurden die MSCs für Differenzierungsversuche verwendet oder mittels Antikörperfärbung im Durchflusszytometer phänotypisiert (siehe Abschnitt 2.2.1).

### **2.1.6 Differenzierung humaner Adipozyten aus MSCs**

Humane MSCs wurden in Kulturschalen (Ø35 cm) mit je 40.000-60.000 Zellen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 50% kultiviert. Danach wurden die Zellen mit adipogenem Medium kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle 48 Stunden. Erste Adipozyten wurden nach 5-7 Tage gebildet. Der Nachweis von Adipozyten erfolgte mit der Oil Red O Färbung (siehe Abschnitt 2.2.5).

### **2.1.7 Differenzierung humaner Chondrozyten aus MSCs**

Zur Differenzierung von Chondrozyten aus hMSCs wurden 5x 10<sup>6</sup> hMSCs benötigt. Dazu wurden die Zellen mit Trypsin in Einzelzellsuspension gebracht und mit einem Chondrozyten Medium vermischt. Die Zellsuspension wurde in einem 15 ml Falcon Röhrchen zentrifugiert (200 xg, 5 min). Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 1 ml des Chondrozyten-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden dann in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und erneut zentrifugiert (200 xg, 5 min). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen im 50 µl Restvolumen resuspendiert. Zur Kultivierung der Zellen wurde eine 24-Well Platte verwendet. Die Zellen wurden in die Mitte des Wells pipettiert. Die Zellen wurden für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert und anschließend wurde 1 ml Medium vorsichtig hinzugefügt. Die Zellkulturdauer betrug 21 Tage. Während dieser Zeit wurde alle drei Tage ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Zellen bildeten einen Zellverband und differenzierten zu Chondrozyten aus. Der Nachweis von Chondrozyten erfolgte mittels Alcian Blau Färbung (siehe Abschnitt 2.2.2).

### **2.1.8 Differenzierung humaner Osteoblasten aus MSCs**

Die Differenzierung von Osteoblasten erfolgte aus hMSCs durch Zugabe von Osteoblasten-Medium. Dabei wurden die Zellen bei Erreichen der Konfluenz passagiert und ab Passage 3 als reife Osteoblasten bezeichnet. Nach der 3. Passage erreichten die Zellen eine maximale Ca<sup>2+</sup>- Einlagerung und stellten die Proliferation langsam ein. Die verwendete Passagenzahl wurde in den Versuchen stets protokolliert.

## 2.2 Histologische und immunologische Färbetechniken

### 2.2.1 Phänotypisierung isolierter humaner mesenchymaler Stammzellen

Aus dem Knochenmark isolierte hMSCs wurden bis zur Konfluenz in MSC-Medium kultiviert und dann nach den Anforderungen der International Society for Cellular Therapy (ISCT) mit bestimmten Oberflächenmarkern charakterisiert. Dazu wurde das MSC Phenotyping Kit (Miltenyi biotec, Bergisch Gladbach) mit folgenden Antikörpern verwendet:

CD14-PerCP (clone: TÜK4, isotype: mouse IgG2a),  
 CD20-PerCP (clone: LT20.B4, isotype: mouse IgG1),  
 CD34-PerCP (clone: AC136, isotype: mouse IgG2a),  
 CD45-PerCP (clone: 5B1, isotype: mouse IgG2a),  
 CD73-APC (clone: AD2, isotype: mouse IgG1),  
 CD90-FITC (clone: DG3, isotype: mouse IgG1),  
 CD105-PE (clone: 43A4E1, isotype: mouse IgG1).

Die Färbung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Zellen wurden in Zellsuspension gebracht und  $1 \times 10^6$  Zellen für die Färbung entnommen. Diese wurden zentrifugiert (300 xg, 10 min) und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde in PBS<sup>-/-</sup>/EDTA mit 0,5% BSA Puffer resuspendiert und auf zwei Röhrchen aufgeteilt - für MSC Phenotyping und für Isotyp-Kontrollen. Es wurden 10 µl der Antikörpermischung oder Isotyp-Kontrolle hinzugegeben und für 10 min im Dunkeln (4°C) inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS<sup>-/-</sup>/EDTA mit 0,5% BSA Puffer gewaschen und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

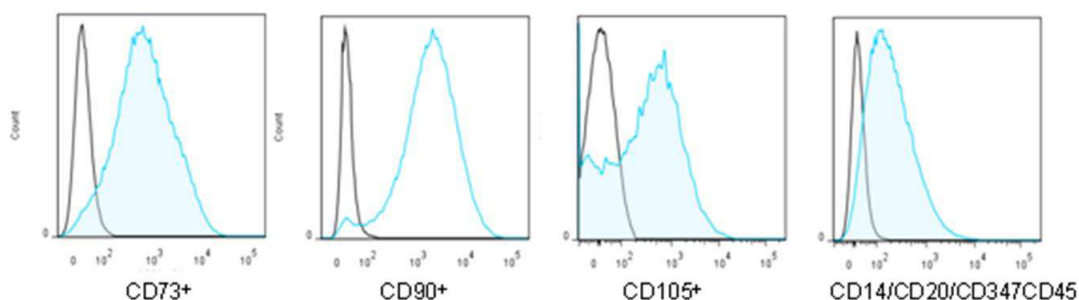


Abbildung 2.2: Phänotypisierung der humanen mesenchymalen Stammzellen nach ISCT. Die Zellen wurden mit anti-CD14, anti-CD20, anti-CD34 und anti-CD45 als Negativmarker und mit anti-CD73, anti-CD90 und anti-CD105 als Positivmarker gefärbt (blaue Histogramm). Die durchsichtigen Histogramme stellen die ungefärbten Isotypkontrollen dar.

### 2.2.2 Alcianblau Färbung der Chondrozyten

Chondrozyten bilden Knorpelgewebe aus und lagern Glycosaminoglykane sowie Proteoglykane ein. Die Glykane werden als Marker für Knorpelgewebe genutzt und mittels Alcianblau Färbung nachgewiesen. Für die Färbung wurden aus den ausdifferenzierten Chondrozyten Krysoschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden kurz mit Wasser angefeuchtet und mit PBS<sup>-/-</sup>

vorsichtig gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit 70% Ethanol für 10 min fixiert und danach zwei mal mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen. Die Alcianblau Färbelösung wurde für 30 min auf den Schnitten inkubiert. Danach wurden die Schnitte kurz mit Wasser abgespült. Die Auswertung erfolgte am Lichtmikroskop (siehe Abb.2.3).

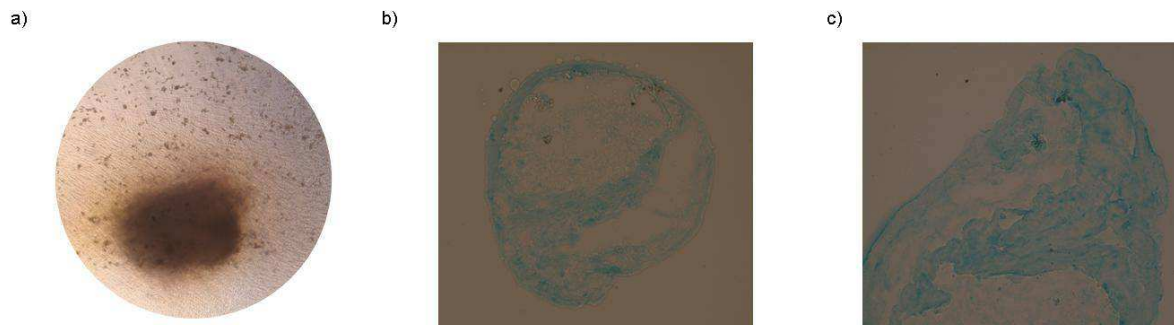


Abbildung 2.3: Alcianblau Färbung der Chondrozyten. Die ausdifferenzierte Chondrozytenkultur (a) wurde nach 21 Tagen fixiert, Kryoschnitte angefertigt und diese mit Alcianblau gefärbt. Der Zellverband (b und c) zeigte eine bläuliche Färbung.

### 2.2.3 Alizarin Red S Färbung von Ca<sup>2+</sup>- Einlagerungen in Osteoblasten

Für Osteoblasten charakteristische Ca<sup>2+</sup>- Einlagerungen dienen dem Aufbau und der Stabilisierung des Knochens. Diese werden mit Fortschreiten der Kultur immer deutlicher und können durch das Färben mit Alizarin Red S sichtbar gemacht werden. Die Zellen wurden mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen und mit eiskaltem Ethanol (70%) für eine Stunde bei RT fixiert. Danach wurde der Ethanol vorsichtig abgenommen und die Proben mit PBS<sup>-/-</sup> (2 x 5 min) gewaschen. Auf die fixierten Zellen wurde Alizarin Red S-Färbelösung vorsichtig mit einer großen Pipette getropft und für 30 min bei RT inkubiert. Nach dem Färben wurden die Zellen mit PBS<sup>-/-</sup> vier Mal gewaschen. Die Färbung der Zellen wurde photographisch dokumentiert und anschließend photometrisch nach Gregory et al 2004 [149] quantifiziert (siehe Abb. 2.4). Dafür wurden 800 µl einer 10%igen (v/v) Essigsäure-Lösung pro Kulturschale hinzugefügt und für 30 min bei RT schüttelnd inkubiert. Der Monolayer wurde dann mit einem Zellschaber abgelöst und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nach dem Mischen (30 s) wurden die Proben für 10 min bei 85°C erhitzt und anschließend auf Eis für 5 min überführt. Die Proben wurden zentrifugiert (20 000 xg, 15 min) und 500 µl des Überstandes wurden in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Danach wurden 200 µl einer 10%igen (v/v) Ammoniumhydroxidlösung hinzugegeben, um die Säure zu neutralisieren. Es wurden 150 µl des Überstandes in einer 96 Well-Format Platte in einem Photometer bei 405 nm gemessen. Die Standardkurve (5 mM bis 0,125 mM) wurde mit Alizarin Red S-Lösung angesetzt.

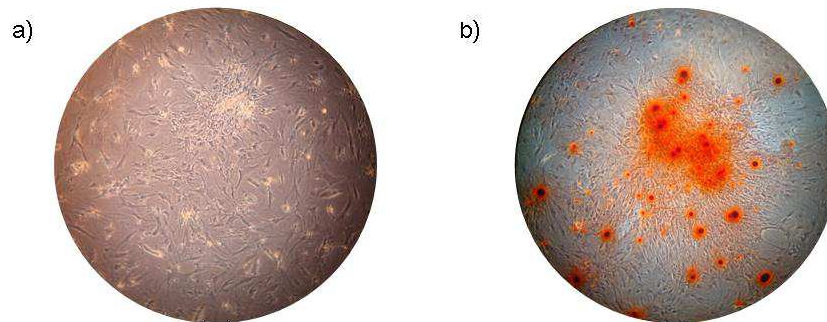


Abbildung 2.4: Alizarin Red S Färbung der Osteoblasten. Die Zellen (a) wurden fixiert und mit Alizarin Red S gefärbt. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Einlagerungen erscheinen rot (b).

#### 2.2.4 Nachweis der alkalischen Phosphatase (ALP) in Osteoblasten

Die alkalische Phosphatase (ALP) besitzt die Eigenschaft, lokale Konzentrationen von anorganischen Phosphaten zu erhöhen, die Mineralisierung voranzutreiben und die extrazelluläre Konzentration von Pyrophosphaten zu reduzieren, welche die Mineralisierung inhibieren. Zum Nachweis der ALP-Aktivität wurden zuerst Zelllysate aus Osteoblasten hergestellt. Das Medium wurde von den Zellen abgezogen und verworfen und der Monolayer wurde mit  $\text{PBS}^{-/-}$  gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin im Brutschrank für 7 min inkubiert und danach die Zellzahl bestimmt. Die Zellsuspension wurde in einem 15 ml Röhrchen zentrifugiert (300 xg, 7 min). Das Pellet wurde in 400  $\mu\text{l}$  einer 1%igen (v/v) Triton X-100 Lösung resuspendiert und für 10-15 min inkubiert.

Für die Konzentrationsmessung von ALP in den Lysaten wurden p-Nitrophenol-Standards in den Konzentrationen 0,5  $\mu\text{mol/ml}$ , 0,4  $\mu\text{mol/ml}$ , 0,3  $\mu\text{mol/ml}$ , 0,2  $\mu\text{mol/ml}$ , 0,1  $\mu\text{mol/ml}$  und 0  $\mu\text{mol/ml}$  hergestellt und im Dunklen bei 4°C bis zu ihrer Verwendung aufbewahrt. Für den Kontrollwert wurde der Substratpuffer (p-Nitrophenyl Phosphate Liquid Substrate System, Sigma) verwendet. Der Ansatz wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. Von den Standards wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  in Duplikaten gemessen. Die Proben wurden ebenfalls in Duplikaten aufgetragen, mit jeweils 50  $\mu\text{l}$ . Auf diese Proben wurden jeweils 50  $\mu\text{l}$  Substratpuffer aufgetragen. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 75  $\mu\text{l}$  Natronlauge (1 M) abgestoppt. Die Absorption wurde in einem Photometer bei 405 nm gemessen und die ALP-Konzentration pro 1  $\mu\text{g}$  Protein bestimmt. Die Proteinkonzentration der Lysate erfolgte mittels Bradford (siehe Abschnitt 2.4.4).



### 2.2.5 Oil Red O Färbung von Adipozyten

Zur Bestimmung von reifen Adipozyten wurde die Oil Red O Färbung verwendet. Die Zellen wurden mit 2 ml PBS<sup>-/-</sup> gewaschen und mit 10% Formalin für 45 min inkubiert. Die Oil Red O-Färbelösung wurde immer frisch angesetzt und filtriert. Die Zellen wurden nach Fixierung mit 2 ml destilliertem Wasser gewaschen, anschließend wurden 2 ml 60% Isopropanol für 5 min hinzugefügt. Isopropanol wurde entfernt und 2 ml der Oil Red O-Färbelösung auf die Zellen pipettiert. Es folgte eine Inkubation für 5 min bei RT. Danach wurde die Färbelösung entfernt, der Monolayer wurde mit Wasser gespült. Die Fetteinschlüsse erschienen rot, bei diesen Zellen handelt es sich um Adipozyten (siehe Abb. 2.5).

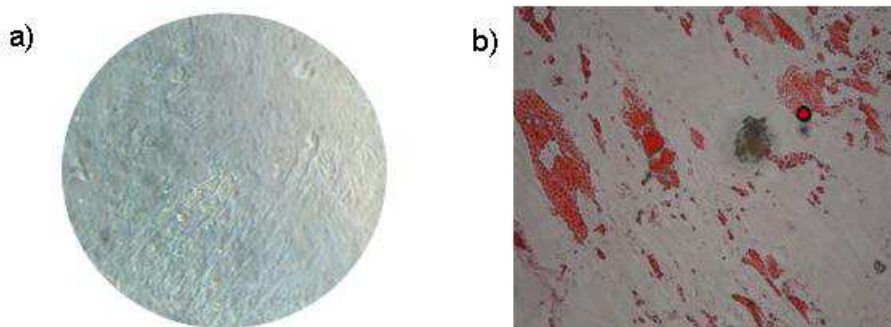


Abbildung 2.5: Oil Red O Färbung der Adipozyten. Die Adipozyten wurden nach 21 Tagen Kultivierung (a) mit Oil Red O gefärbt. Die Vakuolen mit Lipiden erscheinen durch die Färbung rot (b) in 100x Vergrößerung).

### 2.2.6 TRAP und F-Aktin Färbung in Osteoklasten

Zum Nachweis der gebildeten Osteoklasten wurden neben Mehrkernigkeit auch TRAP positive und F-Aktin positive Zellen ausgewertet.

Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) gilt als Indikator für den Knochenabbau. Durch die Dephosphorylierung von Proteinen, z.B. OPN (Osteopontin), wird die Migration und weitere Resorption der Osteoklasten möglich [150]. Die ausdifferenzierten Osteoklasten wurden mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen und mit 3,7% PFA (15 min, 37°C) fixiert. Danach wurden die Zellen mit warmen PBS<sup>-/-</sup> gewaschen und mit TRAP-Färbelösung (5-10 min, 37°C) inkubiert. Die Dauer der Inkubation wurde je nach Ausprägung der Färbung bestimmt. Die Färbelösung wurde entfernt und die Zellen mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen (siehe Abb.3.17).

F-Aktin spielt eine entscheidende Rolle beim Aufbau des Zytoskeletts von Osteoklasten und somit an deren Fähigkeit zur Ausbildung von "ruffle borders". Die Zellen wurden mit 3,7%-PFA 5 min fixiert und danach drei Mal mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen. Zur Permeabilisierung wurde eine

Lösung bestehend aus 0,1% Triton 100 und PBS<sup>-/-</sup> für 5 min auf die fixierten Zellen gegeben. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS<sup>-/-</sup> wurde FITC-gekoppeltes Phalloidin (50 µg/ml in PBS<sup>-/-</sup>) auf die Zellen gegeben und für 40 min im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden anschließend drei Mal mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen und die Kernfärbung mit DAPI (1 µg/ml, 15 min) durchgeführt. Die Proben wurden erneut mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen und anschließend mit Antifade für die Mikroskopie eingedeckelt (siehe Abb. 2.7).

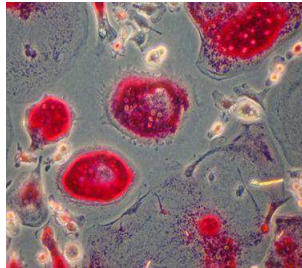


Abbildung 2.6: TRAP-Färbung der Osteoklasten. Die Osteoklasten wurden fixiert und mit TRAP-Färbelösung gefärbt. Die TRAP-positive Osteoklasten erscheinen rosa-rot.

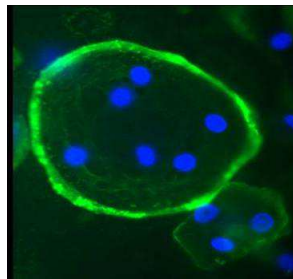


Abbildung 2.7: F-Aktin Färbung der Osteoklasten. Die Zellen wurden mit Phalloidin (grün) für F-Aktin und mit DAPI (blau) für Kerne gefärbt. Die Osteoblasten bilden einen F-Aktin-Ring aus, welcher für die Aktivität der Zellen notwendig ist.

### 2.2.7 Toluidinblau Färbung

Aktive Osteoklasten besitzen die Fähigkeit, die mineralisierte Schicht des Knochens zu resorbieren. Dabei entstehen kleine Einbuchtungen (resorption pits), die direkt auf die Aktivität der Osteoklasten zurückschließen lassen. Dafür wurden die Vorläufer-Monozyten auf Knochenplättchen ausgesät und innerhalb von 14-21 Tagen zu Osteoklasten differenziert (siehe Abschnitt 2.2.6). Am Ende der Kultivierung wurden die Knochenplättchen für 5 min in Ammoniumhydroxid (0,25 M) inkubiert und anschließend die Zellen entfernt. Die Knochenplättchen wurden für 5 min in eine 1%ige (v/v)-Toluidinblau/Sodium Tetraborat Lösung gelegt. Anschließend wurden die Plättchen in PBS<sup>-/-</sup> gewaschen und auf resorption pits unter dem Lichtmikroskop untersucht. Die Auswertung der resorbierten Fläche erfolgte manuell mittels Image J Software. Die resorbierte Fläche wurde markiert und über „analyze particles“- Funktion die Fläche

bestimmt.

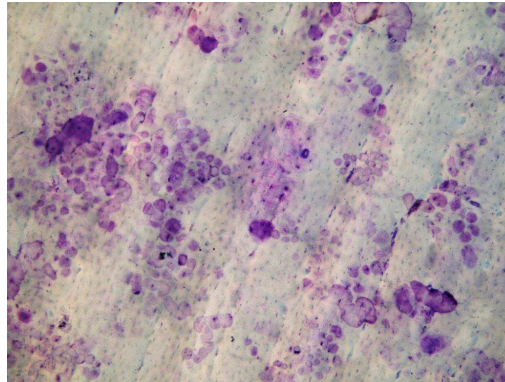


Abbildung 2.8: Toluidinblau Färbung der Knochenplättchen. Die durch Osteoklasten resorbierte Fläche erscheint blau in einer rundlichen Form.

### 2.2.8 Intrazelluläre Antikörperfärbung der Th17 und Treg Zellen

Der Nachweis von IL17<sup>+</sup> Zellen (Th17) sowie Foxp3<sup>+</sup> Zellen (Treg) erfolgte durch eine Antikörperfärbung. Die Färbung erfolgte nach Herstellerangaben (Phenotyping Kit, BD Pharmingen). Die Zellen wurden in Anwesenheit von Brefeldin A (2 µl/ml) für 4 Stunden mit PMA/Ionomycin (10 ng/ml) aktiviert. Anschließend wurden die Zellen in einem Eppendorf-Gefäß zentrifugiert (200 xg, 5 min), das Pellet mit 300 µl einer 1%igen BSA Lösung gewaschen (200 xg, 5 min). Die Zellen wurden im Restvolumen resuspendiert und 200 µl des Puffer A hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde für 15 min im Dunkeln bei RT fixiert und zentrifugiert (300 xg, 5 min). Das Pellet wurde mit 300 µl einer 1%igen BSA Lösung gewaschen (200 xg, 5 min). Nach dem Waschen wurde das Pellet in 200 µl Puffers C resuspendiert und 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach zweifachen Waschen mit einer 1%igen BSA Lösung wurde das Pellet in 100 µl BSA-Lösung mit 10 µl des Antikörper-Cocktails resuspendiert und 40 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Für eine Kernfärbung wurden die Zellen mit DAPI (1 µg/ml) für 15 min inkubiert und anschließend noch einmal gewaschen. Die gefärbten Zellen wurden in PBS/EDTA Puffer resuspendiert und am FACS Canto II (BD) analysiert (siehe Abb. 2.9).

### 2.2.9 Annexin V-Färbung zur Apoptose-Detektion

Phosphatidylserin (PS) ist ein negativ geladenes Phospholipid, das auf der Innenseite der Plasmamembran von fast allen eukaryontischen Zellen lokalisiert ist [151]. Die Umverteilung von PS von der Innen- zur Außenseite der Plasmamembran ist ein Prozess der bereits sehr früh während der Apoptose auftritt [151, 152]. PS dient unter anderem als Signalmolekül für Makrophagen und ermöglicht die Phagozytose von apoptotischen Zellen [Fadok.2000]. Annexin V ist ein 35 kDa großes Membranprotein von Makrophagen, welches Phospholipide bindet [153]. In der späten Phase der Apoptose sowie in nekrotischen Zellen kommt es zu einem



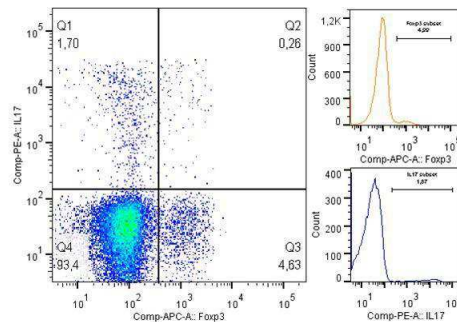


Abbildung 2.9: Durchflusszytometrische Auswertung der intrazellulären Antikörperfärbung der Th17 und Treg Zellen. Die Fluoreszenzsignale von IL-17 und Foxp3 wurden gegeneinander aufgetragen und mittels Gate positiven und negativen Ereignisse festgelegt.

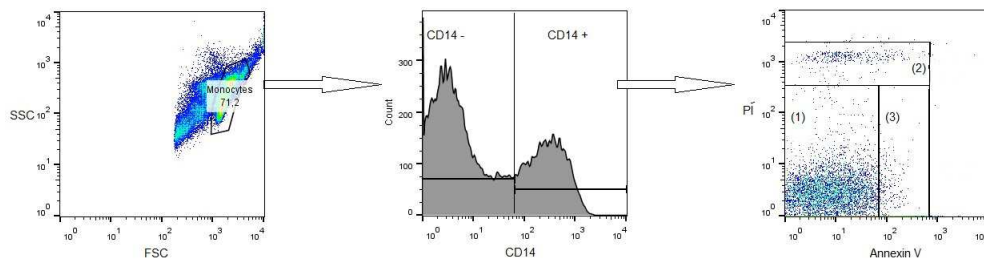


Abbildung 2.10: Durchflusszytometrische Apoptose-Messung in humanen Monozyten mittels Annexin V-Färbung. Zunächst wurde die Zellpopulation im SSC/FSC-Plot ausgewählt und dieser CD14<sup>+</sup>-Monozyten bestimmt. In einem weiteren Schritt wurde der Anteil an lebenden (1), nekrotischen bzw. spät-apoptotischen (2) und früh-apoptotischen (3) Zellen unter den CD14-positiven Monozyten bestimmt.

Verlust der Membranintegrität, so dass auch die Innenseite der Plasmamembran für Annexin V zugänglich wird [152]. Um diese früh- und spät-apoptotischen Zellen bzw. nekrotischen Zellen voneinander zu unterscheiden, wurde der Farbstoff Propidiumiodid (PI) verwendet. PI färbt sowohl DNA als auch RNA Moleküle und kann nicht durch eine intakte Zellmembran diffundieren. Somit können durch PI nur spät-apoptotische sowie nekrotische Zellen angefärbt werden.

Für die Apoptose-Messung wurden die adhärenenten Monozyten mittels Trypsin von Zellkulturboden gelöst (15 min, 37 °C ). Um das Trypsin zu entfernen wurden die Zellen bei 300 xg für 10 min zentrifugiert und anschließend in PBS resuspendiert. Die Zellzahl wurde bestimmt und jeweils 1 Millionen Zellen mithilfe des Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V Alexa Fluor 488 & Propidium Iodide (PI) (Life Technologies, Carlsbad) laut Herstellerangaben gefärbt. Im Anschluss wurden die gefärbten Monozyten im Durchflusszytometer analysiert. Die gating-strategie ist in der Abb.2.10 gezeigt.

## 2.3 Zellzyklusanalyse

Durch ionisierende Strahlung entstandene Schäden in der Zelle können Auswirkungen auf die Progression im Zellzyklus haben. Im Durchflusszytometer wurde mittels Fluoreszenzmarkierung der DNA die Verteilung der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen anhand der Fluoreszenzintensität bestimmt. Um die Zellzyklusverteilung der bestrahlten Zellen (z.B. Osteoblasten) zu verfolgen, wurden die Zellen mit DAPI markiert und anschließend im Durchflusszytometer gemessen.

Dafür wurden die Zellen trypsinisiert (8 min, 37°C) und anschließend für 8 min bei RT mit 3,7% PFA fixiert. Die fixierten Zellen wurden zwei Mal mit PBS<sup>-/-</sup> (300 xg, 5 min) gewaschen und mit DAPI (1 µg/ml, 15 min) gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS<sup>-/-</sup> (300 xg, 5 min) gewaschen und im Durchflusszytometer gemessen.

Wie in Abb.2.11 dargestellt wurde die Zellpopulation anhand des Vorwärts- und Seitwärtstreulichtes identifiziert und die Fluoreszenzintensität im 405nm Kanal für DAPI bestimmt. Die einzelnen Zellzyklusphasen wurden mit der FlowJo Software (V6.5) ausgewertet und deren prozentuale Verteilung bestimmt (siehe Abb.2.11).

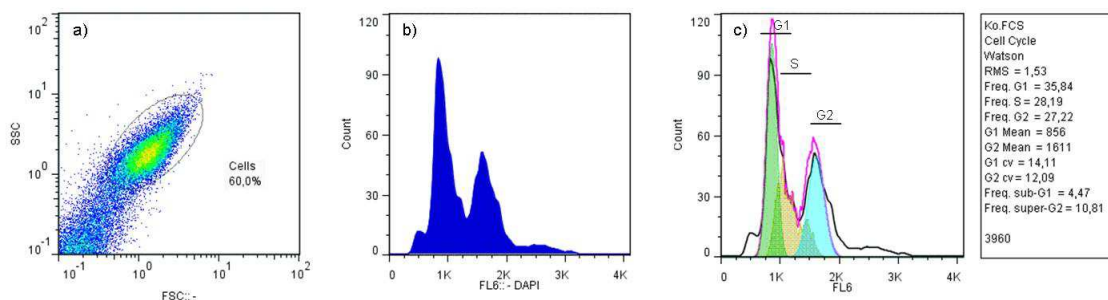


Abbildung 2.11: Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse. Die Zellen wurden mit DAPI gefärbt und der DNA-Gehalt mittels Durchflusszytometer gemessen. Die Zellpopulation wurde im SSC/FSC-Plot ausgewählt, der DNA-Gehalt im 405nm (Pacific blue) Kanal bestimmt und anschließend die Zellzyklusverteilung mit der FlowJo Software analysiert.

## 2.4 Protein-Nachweismethoden

Zur Bestimmung der freigesetzten Proteinkonzentration wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Techniken verwendet: ELISA und Bead Immunoassay. Die gesamte Proteinmenge in den Zellen wurde mittels Western Blot nachgewiesen.

### 2.4.1 ELISA

Das Funktionsprinzip des ELISA Systems beruht auf der spezifischen Wechselwirkung zwischen Antikörper und dem entsprechenden Antigen. Der Antikörper bindet spezifisch das gelöste Antigen, welches dann durch eine Farbreaktion des Amplifikators am sekundären

Antikörper photometrisch detektiert wird. Die Konzentration des gebildeten Farbstoffs ist dabei proportional zur Konzentration des entsprechenden Antigens.

Die Durchführung der jeweiligen ELISA (RANKL, OPG, TRAP) erfolgte nach Herstellerangaben. Zunächst wurde die Mikrotiterplatte mit Antikörper über Nacht beschichtet und mit 300  $\mu$ l Waschpuffer mehrere Male gewaschen. Nach dem letzten Schritt wurden die Reste von Waschpuffer auf einem Papiertuch abgeklopft. Danach wurde 300  $\mu$ l Blockpuffer für eine Stunde zum Blockieren der unspezifischen Bindestellen auf der Platte inkubiert. Nach erneutem Waschen (4x) mit Waschpuffer wurden je 100  $\mu$ l von Standardkurve und Proben in der Platte für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Platte erneut gewaschen und ein sekundärer Antikörper (100  $\mu$ l) hinzugegeben. Nach 2 Stunden Inkubation wurde nicht-gebundene Antikörper durch das Waschen entfernt und die Avidin Peroxidase oder Streptavidin-HRP für 30 min auf die Platte aufgetragen. Anschließend erfolgte ein Waschschritt und die Zugabe von Substrat (ABTS oder TMB). Die Entwicklung der Farbreaktion wurde innerhalb von 30 min beobachtet und bei 405 nm oder 450 nm im Photometer detektiert.

Anschließend wurde die Konzentration des freigesetzten Proteins anhand der Standardkurve berechnet.

#### 2.4.2 Fluoreszenz-basierter Bead Immunoassay

Neben der konventionellen Messung der Proteine mittels ELISA wurde ebenfalls ein Fluoreszenz-basierter Bead Immunoassay (ebioscience, San Diego) zur Analyse herangezogen. Das Prinzip des Assays beruht auf Antikörpern-beschichteten Mikrokugeln, welche spezifisch mit Analyt reagieren. Durch den Einsatz von Mikrokugeln mit unterschiedlicher Größe und unterschiedlichen Fluoreszenzspektren ist es möglich, mehrere Proteine und deren Konzentration in einer Probe gleichzeitig zu detektieren.

Die Mischung von Mikrokugeln wurde mit der Probe inkubiert, dabei bindet Analyt an entsprechende Antikörper auf den Mikrokugeln. Im nächsten Schritt wurde ein mit Biotin-konjugierter Zweitantikörper hinzugegeben, welcher spezifisch an Analyt bindet. Streptavidin-Phycoerythrin wurde zur Fluoreszenzmarkierung des Biotin-Konjugats hinzugegeben (siehe Abb.2.12). Die so markierten Analyten wurden anschließend mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit FlowCytomix Pro Software (ebioscience, San Diego).

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Zunächst wurde eine serielle Verdünnung der Standardbeads (je 10  $\mu$ l) mit Assay Puffer gemacht. Danach wurde die Filterplatte mit 50  $\mu$ l Assay Puffer gewaschen unter Verwendung von Vacuumfiltration. Die Standardkurve wurde auf die Platte pipettiert gefolgt von Proben (je 25  $\mu$ l). Anschließend wurde zu den Proben 25  $\mu$ l Beadmischung und 50  $\mu$ l Biotin-Konjugat hinzugefügt. Die Platte wurde mit einer Klebefolie abgedichtet und lichtgeschützt für 2 Stunden auf einem Schüttler bei 500 rpm inkubiert. Danach wurde die Platte mit Assay Puffer gewaschen und 50  $\mu$ l Streptavidin-Phycoerythrin Lösung hinzugegeben. Nach einer Stunde Inkubation wurde die Platte erneut gewaschen und die Proben im Durchflusszytometer gemessen.

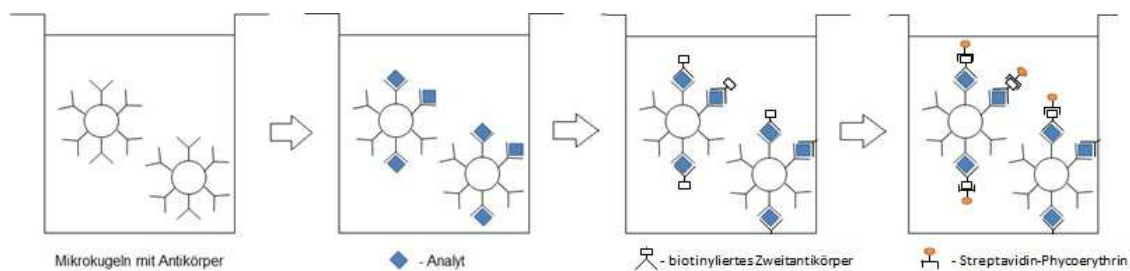


Abbildung 2.12: Schematische Darstellung des Fluoreszenz-basierten Bead Immunoassays. Analyt bindet zunächst an mit Antikörper beschichtete Mikrokugeln und im nächsten Schritt spezifisch an den biotinylierten Zweitantikörper. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgt anschließend durch Streptavidin-Phycoerythrin.

### 2.4.3 Herstellung der Zellysate

Für die Analyse der Proteinexpression wurden die Zellen lysiert. Dazu wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS<sup>-/-</sup> gewaschen. Die adhären Zellen wurden nach dem Entfernen von PBS<sup>-/-</sup> trypsinisiert und zentrifugiert (300 xg, 8 min). Der Überstand wurde entfernt und Zellen wurden mit 4°C kaltem RIPA Puffer versetzt. Die Zellen wurden gut durchgemischt und für 15 min auf Eis schüttelnd inkubiert. Die Zellsuspension wurde mit einer Spritze (26G) einige Male zusätzlich resuspendiert. Anschließend wurde die Probe bei 12 000 xg 10 min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand bei -20°C eingefroren.

### 2.4.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration des Zellysats wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Hierbei wurde als Reagenz zur kolorimetrischen Bestimmung Coomassie-Brilliant-Blau verwendet. Zur Erstellung der Standardkurve wurde Rinderserumalbumin (BSA) in Konzentrationen zwischen 5-40 µg/ml verwendet.

### 2.4.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

In der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wandern Proteine in einem elektrischen Feld durch ein Polyacrylamid-Gel, welches mit 12% SDS (sodium dodecyl sulfate) versetzt ist. Dabei werden die Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Die Proteine wurden zunächst in einem Sammelgel gesammelt und anschließend in einem Trenngel nach der Proteingröße aufgetrennt. Es wurde ein 12%-Trenngel verwendet, welches mit Hilfe des Mini-Protean 3 Elektrophoresis Systems (Bio-Rad, München) hergestellt wurde. Die Proben wurden im Verhältnis 1:2 mit Mercaptoethanol-SDS-Puffer versetzt und für 10 min bei 90°C denaturiert. Diese wurden zunächst abgekühlt, abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Die Protein-Auftragsmenge variierte zwischen 10-30 µg, zusätzlich wurde auf das Gel ein Proteinmarker (PageRuler Prestained Ladder, Fermentas Life Science, USA) aufgetragen. Die Gelelektrophorese lief bei 400 V, 16 mA konstant in 1xSDS-Laufpuffer für 2,5-3 Stunden. Die eingestellten Werte für Stromstärke und Spannung richten sich für zwei

Gele in einer Apparatur.

#### 2.4.6 Western Blot

Zur Übertragung der Proteine vom Gel auf eine Trägermembran und zur anschließenden Detektion, wurde das Western Blot Verfahren angewendet. Der sogenannte Blotting-Vorgang beruht auf dem Elektrotransfer der Proteine auf eine PVDF-Membran. Die übertragenen Proteine haften auf der Membran aufgrund hydrophober Wechselwirkungen.

Zum Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel auf eine PVDF-Membran (Millipore) wurde die Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Biorad, München) verwendet. Der Transfer wurde mit 100 V und 400 mA konstant für 2 Stunden bei 4°C durchgeführt.

Die Blockierung der unspezifischen, freien Bindungsstellen auf der Membran wurde mit 5% Magermilchpulver (2 Stunden, RT) durchgeführt. Im Anschluss wurde die Membran mit monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern gegen die untersuchten Proteine beladen. Die unspezifisch gebundenen Antikörper wurden mittels mehrerer Waschschrte (3 x 10 min) mit Puffer (1 x TBS-T) wieder entfernt. Über einen sekundären Antikörper, welcher speziesabhängig gegen den Fc Teil des ersten Antikörpers gerichtet ist und an eine Peroxidase gebunden ist, kann ein Chemilumineszenzsubstrat (GE Healthcare) zu einer Lichtemission angeregt und mit einer CCD Kamera detektiert werden. Die Auswertung der Blots erfolgte mit Fusion Software (Peglab).

#### 2.4.7 TRAP-Aktivitätsmessung

Für die Messung der TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase)-Aktivität in Kulturüberständen wurde das TRAP Staining Kit (B-Bridge International, Sitz) verwendet. Die Kulturüberstände wurden über die Kultivierungsdauer steril gesammelt und direkt bis zur weiteren Verwendung bei -80°C tiefgefroren. Nach dem Auftauen der Zellüberstände auf Eis wurden diese wie vom Hersteller angegeben mit dem Substrat-Puffer-Gemisch inkubiert und anschließend die Absorption bei 540 nm photometrisch bestimmt. Für die Auswertung wurde ein Blank mit Medium ohne Zellen mitgeführt und dessen Absorptionswert von den Messwerten der Proben substrahiert. Zur Bestimmung der spezifischen TRAP-Aktivität wurden die Absorptionswerte auf den Proteingehalt in µg/µl normiert.

## 2.5 Nachweis der Genexpression in humanen Osteoblasten mittels qRT-PCR

### 2.5.1 RNA Isolierung

Die RNA Isolierung erfolgte mit dem RNeasy Mini kit von Qiagen nach Herstellerangaben. Dafür wurden  $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  Zellen als Pellet in 350 µl RLT Puffer resuspendiert und 1 % Vol. 70% Ethanol hinzugefügt. Die Zellen wurden gut gemischt und 700 µl der Zellsuspension auf die Mini-Säule pipettiert. Das Eppendorf-Gefäß, in dem sich die Säule befand, wurde 15s bei 8000 xg zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit 700 µl RW1 Puffer 15 s bei

8000 xg gewaschen. Danach folgten zwei Waschschrirte mit je 500  $\mu$ l RPE Puffer. Die Säule wurde anschließend auf ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die RNA mit 50  $\mu$ l des RNase-freien Wassers eluiert (1 min, 8000 xg).

Danach erfolgte die RNA-Konzentrationsmessung bei 260nm. Die Reinheit der RNA ergibt sich aus den Quotienten OD260 und OD280, welcher bei reiner RNA den Wert 2 hat.

### 2.5.2 cDNA Synthese

Die reverse Transkription wurde mit dem „RevertAid<sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis“ Kit von Fermentas durchgeführt. Die Reaktion erfolgte nach Herstellerangaben mit 1  $\mu$ g isolierter RNA und oligo (dT)18 Primer (100  $\mu$ M), weshalb aus der gesamten RNA ein RNA-DNA-Hybridstrang synthetisiert wurde. Die verwendete reverse Transkriptase RevertAid M-MuLV RT besaß eine Aktivität von 200 U/ $\mu$ l und die dNTPs wurden mit einer Konzentration von 10 mM eingesetzt. Um eine RNA-Degradation zu vermeiden, wurde ein RNase Inhibitor (20 U/ $\mu$ l) hinzugefügt. Anschließend wurde der Ansatz gut durchmischt und kurz zentrifugiert. Es folgte eine Inkubation für 60 min bei 42°C und danach für 5 min bei 70°C. Das Syntheseprodukt wurde bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Tabelle 2.1: cDNA Synthese.

Template RNA	total RNA	1 $\mu$ g
Primer	primer	1 $\mu$ l
Nuklease-freies Wasser	auf 12 $\mu$ l	
5X Reaction Buffer	4 $\mu$ L	
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	
10 mM dNTP Mix	2 $\mu$ l	
RevertAid M-MuLV RT (200 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	
Total volume	20 $\mu$ l	

Tabelle 2.2: PCR-Ansatz

SYBR Green MasterMix	12,5 $\mu$ l
Wasser	7,5 $\mu$ l
Primer	2,5 $\mu$ l
cDNA	2,5 $\mu$ l
QuantiTech Primer Assay	2,5 $\mu$ l
Total volume	25 $\mu$ l

### 2.5.3 Quantitative real-time PCR

Die quantitative real-time PCR wurde mit dem „QuantiFast SYBR Green PCR Kit“ von Qiagen durchgeführt, wobei die Herstellung der cDNA wie unter 2.1 beschrieben erfolgte. Die Quotienten aus A260nm/A280nm lagen bei 2,0 für Osteoblasten-RNA. Für die PCR wurde cDNA Konzentration unmittelbar vor dem Ansatz gemessen und in Konzentrazion von 25 ng/ $\mu$ l eingesetzt. Für jede Probe wurde ein zweifacher Reaktionsansatz gemacht (siehe Tab. 2.2).



Der PCR-Ansatz bestand aus einem MasterMix, der unter anderem den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I enthielt, die Primern (0,6  $\mu$ M; Primesequenz), 2,5  $\mu$ l QuantiTech Primer Assay und 2,5  $\mu$ l cDNA (10% des Ansatzvolumens). Der Einbau des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green I in die doppelsträngige DNA führt zu einem Fluoreszenzsignal. Anhand der Messung des Fluoreszenzsignals am Ende von jedem Zyklus kann die Zunahme der synthetisierten DNA festgestellt werden.

Neben den Primern für RANKL, OPG und RUNX2 wurde auch ein Primer für das Haushaltsgen GAPDH verwendet. GAPDH wurde als Referenzgen angewendet, um biologische Variationen zu vermeiden. Dabei sollten die Ct Werte des Referenzgenes gleich für die Probe und für die Kontrolle bleiben. Die Expression des Zielgens wurde dann mit der Expression des GAPDH verglichen. Die zweistufige PCR wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Tabelle 2.3: Gene-Cycler Programm für two-step RT-PCR

Step	Zeit	Temperatur	Kommentare
PCR-Aktivierungsschritt	5 min	95°C	aktiviert HotStarTag Plus DNA Polymerase
2-step cycling:			
<b>Denaturierung</b>	5 s	95°C	
Annealing/extension	10 s	60°C	Sammeln der Fluoreszenzdata
Anzahl der Zyklen	35-40		Anzahl der Zyklen abhängig von cDNA-Menge

PCR wurde am ABI StepOne Plus Gerät von Applied Biosystems durchgeführt. Es wurde die Comparative Ct Methode mit Schmelzkurvanalyse angewendet. Die Schmelzkurvanalyse erlaubt Ziel-DNA von unspezifischen PCR-Produkten zu unterscheiden.

## 2.6 Patientenstudie RADON

### 2.6.1 Design der Studie

Die Studie zu “Immunophänotypische Bestimmungen aus Blut von Patienten mit muskuloskelettalen Beschwerden nach Radon- und Radon/CO<sub>2</sub>-Behandlung (RAD-ON01)” umfasste eine Gruppe von 100 Patienten, die ausschließlich in der therapeutischen Einrichtung Bad Steben behandelt wurden. Die Behandlung wurde für die Patienten, die Experimentatoren, die Mitarbeiter und Therapeuten blind durchgeführt. Die Entblindung erfolgte erst am Ende der Untersuchungen (6 Monate nach Therapie). Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Bayerischen Landesärztekammer genehmigt (Ethik-Kommissions Nr. 12131).

### 2.6.2 Patienten

Es handelt sich um eine verblindete und explorative Pilotstudie mit zwei Gruppen von jeweils 50 Patienten, die mit 100% Radonwasser oder einer Mischung aus Radonwasser und CO<sub>2</sub>-haltigen Heilquelle (50% /50%) behandelt wurden.

Die Einschlusskriterien für Patienten waren folgende:

- (1) Alter mindestens 18 Jahre, bis 75 Jahre
- (2) Chronisch degenerative Wirbelsäulen- und Gelenkbeschwerden
- (3) Schmerzdauer über mindestens 1 Jahr
- (4) Schmerintensität VAS > 4
- (5) Effektive Kontrazeption
- (6) Erreichbarkeit der Patienten (geographische Nähe) für Behandlung und Follow-up
- (7) Kooperationsbereitschaft der Patienten
- (8) Durchgeführte Patientenaufklärung und schriftliche Einwilligung
- (9) Keine Teilnahme an anderen Studien (3 Monate vor und) während der Teilnahme

Ebenfalls wurden folgende Ausschlusskriterien festgelegt:

- (1) Schwangere oder stillende Frauen
- (2) Gebär- bzw. zeugungsfähige Menschen, die nicht zu konsequenten Verhütungsmaßnahmen während der Therapie willens oder in der Lage sind
- (3) Herzinsuffizienz > NYHA II oder EF >40%
- (4) Nicht einstellbare Hypertonie >180/90 mmHg
- (5) Manifeste, medikamentös nicht einstellbare Schilddrüsenüberfunktion
- (6) Akute entzündliche oder konsumierende Prozesse
- (7) Anhaltender Drogen-, Medikamenten- oder Alkoholmissbrauch
- (8) Patienten, die nicht in der Lage oder bereit sind, sich protokollgerecht zu verhalten und behandeln zu lassen
- (9) Fehlende Bereitschaft zur Speicherung und Weitergabe der persönlichen Krankheitsdaten im Rahmen des Protokolls
- (10) Gleichzeitige Teilnahme an einer anderen klinischen Studie

### 2.6.3 Radontherapie

Die Therapie in Form von Bädern (9 Bäder für je 20 min) wurde über 3 Wochen angewandt. Die mittlere Aktivität war 40 Bq/min, die Temperatur 37°C und Luftfeuchtigkeit 60%.

### 2.6.4 Klinische und diagnostische Untersuchungen

Die Patienten wurden vor der Therapie, direkt im Anschluss und 3, 5 und 7 Monate nach Therapie befragt und vom Arzt untersucht. Die Blutproben der Patienten wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten 24 Stunden nach Entnahme auf verschiedene Faktoren untersucht. In Rahmen dieser Arbeit wurde das Verhältnis von Th17 zu Treg Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Neben einer T-Zell-Verteilung wurden Marker für Knochenmetabolismus sowie OPG, RAMKL, BoneTRAP, Typ I- Kollagenfragmente und knochenspezifische alkalische Phosphatase (BAP) mittels ELISA in der Blutplasma untersucht.



## 2.7 Bestrahlung

### 2.7.1 X-ray Bestrahlung

Die Zellen in Kulturflaschen oder in Petrischalen wurden unter Verwendung einer IV320-13 Röntgenröhre (Siefert) mit einer Beschleunigungsspannung von 250 kV und einem Kathodenstrom von 16 mA bestrahlt. Die Dosisleistung war 1 Gy/min und die Dosimetrie wurde mit der Ionisationskammer (SN4 Dosimeter, PTW) durchgeführt. Die Zellen wurden bei RT bestrahlt und anschließend zur Weiterkultivierung in den Brutschrank überführt.

### 2.7.2 Klonogenes Zellüberleben

Das klonogene Überleben der Zellen erlaubt die Berechnung des Überlebens der Zellen nach Bestrahlung mit einer bestimmten Dosis, normiert auf das Überleben von Kontrollzellen.

Die Zellen wurden bis zur Subkonfluenz kultiviert, trypsinisiert und bestrahlt. Anschließend wurden die bestrahlten Zellen nach dem Schema wie in Tabelle 3.5 in Zellkulturflaschen eingesät: Die Zellen wurden 14 Tage kultiviert. Anschließend wurde das Medium von den

Tabelle 2.4: Einsaat der Osteoblasten zur Bestimmung des klonogenen Überleben

Osteoblasten	Einsaat/75 cm <sup>2</sup>
Kontrolle	500
	750
	1000
0,5 Gy	1000
	1500
	2000
1 Gy	1000
	2500
	5000
2 Gy	5000
	10000
	15000

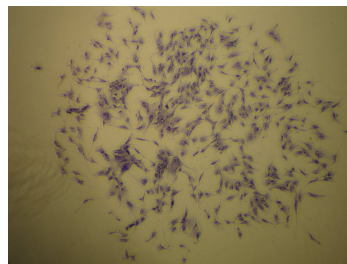


Abbildung 2.13: Osteoblasten-Kolonie. Die bestrahlten Osteoblasten wurden nach 14 Tagen Kultivierung mit Methylenblau gefärbt und die Gesamtheit aller gebildeten Kolonien (>50 Zellen) ausgezählt.

Zellen entfernt und die Zellen mit Methylenblau-Lösung für 30 min gefärbt. Die Färbelösung

wurde entfernt und die Flaschen mit destilliertem Wasser gespült. Es erfolgte die Auszählung der Kolonien ( $> 50$  Zellen) unter einem Lichtmikroskop (siehe Abb.2.13).

# Kapitel 3

## Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von ionisierender Strahlung auf die Differenzierung und Proliferation von Zellen untersucht, die eine aktive Rolle im Knochenmetabolismus spielen und an entzündlichen Vorgängen im Knochen und Gelenken beteiligt sind. Als dabei mitwirkende Zelltypen wurden humane primäre Osteoblasten, Osteoklasten sowie T-Helferzellen (Th17) und regulatorische T-Zellen (Tregs) untersucht. Die Zellen wurden nach Einwirkung von dünn-ionisierender Strahlung (Röntgenstrahlung) auf Veränderungen in der Proliferation, Differenzierung und Freisetzung von Zytokinen analysiert und funktionelle Tests durchgeführt. Außerdem standen Zellen aus dem Serum von Patienten nach Radontherapie zur Verfügung.

### 3.1 Einfluss von Strahlung auf die Differenzierung humaner Osteoblasten

Osteoblasten haben als knochenbauende Zellen eine wichtige Funktion während der Entwicklung und auch bei einer Behandlung einer Knochenerkrankung. Für die Untersuchungen wurden Osteoblasten zunächst aus mesenchymalen Stammzellen (MSCs), welche aus Knochenmark gesunder Spender gewonnen wurden, differenziert. Bislang ist wenig bekannt über die Wirkung von ionisierender Strahlung auf das Überleben und die Proliferation von Osteoblasten, so dass dies in den ersten Experimenten untersucht wurde. In bestrahlten Osteoblasten wurde zudem die Veränderungen der typischen  $\text{Ca}^{2+}$  Einlagerungen, Expression der alkalischen Phosphatase oder anderer relevanter Proteine, die am Knochenaufbau beteiligt sind, untersucht. Osteoblasten stehen im engen Kontakt mit anderen Zellen des Knochens, so dass freigesetzte Zytokine/Proteine ebenfalls entscheidend zum Gesamtmetabolismus des Knochens beitragen können. Aus diesem Grund erfolgte die Bestimmung von freigesetzten Zytokinen im Mediumüberstand der behandelten Zellkultur.

#### 3.1.1 Immunphänotypische Merkmale humaner mesenchymaler Stammzellen

Die Isolierung von MSCs mittels magnetischer Antikörper-Beads, welche spezifisch an den Oberflächenmarker CD271 binden, ermöglicht eine besonders reine Isolierung der Zellen aus

dem Knochenmark. Aufgrund des geringen Probenvolumen bei Knochenmark wurde jedoch die Isolierung mittels Plastikadhärenz bevorzugt. Für die Differenzierung der Osteoblasten aus MSCs wurden die durch Plastikadhärenz gewonnenen Stammzellen phänotypisiert und deren Reinheit bestimmt. Die zellspezifischen Oberflächenmarker wurden nach Anforderungen der International Society for Cellular Therapy (ISCT) mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die MSCs sollen überwiegend CD105, CD90 und CD73 exprimieren, während sie CD45, CD34, CD20 sowie CD14 nicht exprimieren (International Society for Cellular Therapy, ISCT. [154]). Im Rahmen der Messungen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass der überwiegende Anteil der Zellen CD105 positiv ( $97\% \pm 2$ ) und CD90 positiv ( $97\% \pm 2$ ) sind (siehe Abb.3.1). Hingegen wurden nur  $33\% (\pm 23)$  der Zellen für CD73 positiv gemessen. Die Oberflächenexpression der CD45, CD34, CD20 und CD14 wurde in  $57\% (\pm 18)$  der Zellen gemessen. Da die Zellen aus Knochenmarkaspiraten mittels Plastikadhärenz gewonnen werden und mindestens zwei Passagen bis zur durchflusszytometrischen Analyse durchlaufen, ist es anzunehmen, dass ein Anteil von hämatopoetischen Progenitoren in der Zellpopulation verbleibt. Die Verunreinigung durch die hämatopoetischen Progenitoren wurde durch weitere Osteoblasten-spezifische Kultivierung minimiert.

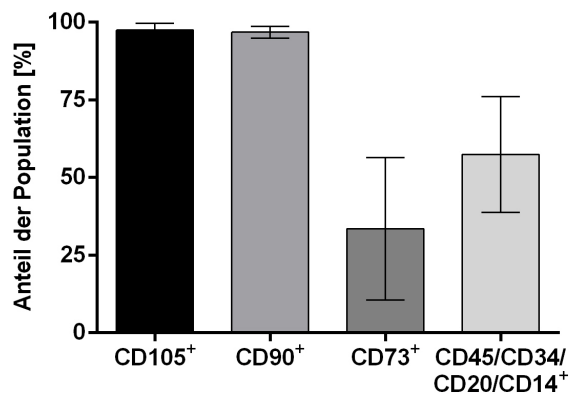


Abbildung 3.1: Durchflusszytometrische Phänotypisierung humaner mesenchymalen Stammzellen. Die Färbung erfolgte mit dem MSCs Phenotyping Kit von Mitenyi Biotec nach ISCT-Richtlinien für CD105-PE, CD90-FITC und CD73-APC sowie mit CD45, CD34, CD20 und CD14-PerCP. N=3, Mittelwert, SEM.

### 3.1.2 Nachweis der multipotenten Eigenschaft von mesenchymalen Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen besitzen die Fähigkeit in verschiedene Zellarten zu differenzieren, unter anderem in Adipozyten, Osteoblasten oder Chondrozyten [155]. Zum Nachweis dieser Multipotenz wurden MSCs unter entsprechenden Bedingungen kultiviert (siehe Abschnitt 2.1). Anschließend erfolgte die zellspezifische Färbung.

Im Rahmen der Experimente in dieser Arbeit differenzierten die aus dem Knochenmark isolierten Stammzellen zu Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten und wurden mittels

spezifischen Färbungen eindeutig nachgewiesen (siehe Abb.3.2). Die Fähigkeit, in Osteoblasten zu differenzieren wurde anhand der  $\text{Ca}^{2+}$  Einlagerungen mittels der Alizarin Red S Färbung nachgewiesen. Die Chondrozyten bildeten im Laufe der Differenzierung Glykane, welche mit Alcianblau in Kryoschnitten gefärbt wurden. Die Fetteinschlüsse in differenzierten Adipozyten wurden mit der Oil Red O Färbung sichtbar gemacht.

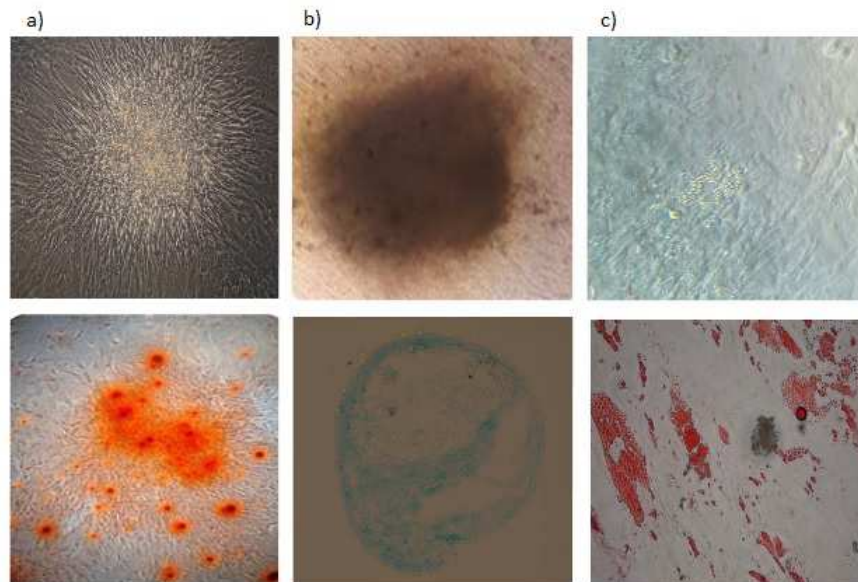


Abbildung 3.2: Nachweis der Multipotenz humaner mesenchymaler Stammzellen. MSCs wurden differenziert in (a) Osteoblasten mit Alizarin Red S gefärbt, (b) Chondrozyten mit Alcianblau sowie (c) Adipozyten mit Oil Red O gefärbt.

### 3.1.3 Proliferation und Zellzyklusverteilung von Osteoblasten

Die Auswirkung von Röntgenstrahlung auf die Proliferation und Zellzyklusverteilung der Osteoblasten wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen untersucht. Es wurde festgestellt, dass die Zellzahl von bestrahlten Osteoblasten im Vergleich zu den Kontrollen dosisabhängig erniedrigt ist. Bereits am dritten Tag nach Bestrahlung wurde eine geringere Zellzahl in den mit 0.5 Gy und mit 2 Gy bestrahlten Proben in Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Die niedrigere Zellzahl in bestrahlten Proben hielt über den gesamten Kultivierungszeitraum an. Nach 14 Tagen Kultivierung war die Zellzahl gegenüber der Kontrolle um 35% ( $\pm 9\%$ ) nach Bestrahlung mit 0.5 Gy und von 56% ( $\pm 8\%$ ) nach Bestrahlung mit 2 Gy im Vergleich zu den Kontrollen verringert (siehe Abb.3.3).

Neben Zellzahlbestimmung nach Bestrahlung wurde die Zellzyklusverteilung in Folge einer Bestrahlung bestimmt. Wie in der Abb.3.4 dargestellt, wurde die Zellzyklusverteilung zunächst über die ersten 48 Stunden nach Bestrahlung bestimmt und anschließend über einen längeren Zeitraum von 21 Tage. Die Zellzyklusanalyse in den ersten 48 Stunden ergab, dass die mit 0.5 Gy Röntgenstrahlung bestrahlten Zellen eine ähnliche Zellzyklusverteilung wie die

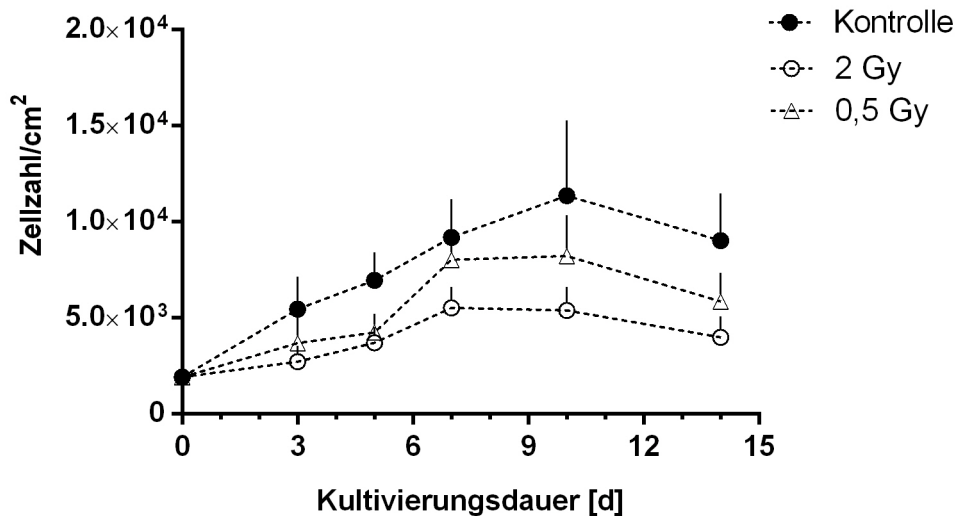


Abbildung 3.3: Wachstum humaner primären Osteoblasten nach Röntgenbestrahlung. Die Zellen wurden mit 0.5 und 2 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt und über einen Zeitraum von 14 Tagen kultiviert. Die Zellzahlbestimmung wurde nach Trypsinierung der Zellen durchgeführt. N=6; Mittelwert mit positiven SD-Anteil.

unbestrahlten Osteoblasten aufwiesen, während mit 2 Gy bestrahlte Zellen nach 48 Stunden in G2/S-Phase akkumulierten. Die weiterführende Analyse zwischen 3 und 21 Tagen zeigte auf, dass deutlich mehr bestrahlte Osteoblasten (0.5 und 2 Gy) 7 Tage nach Bestrahlung in G2/S-Phase akkumulierten. Nach 21 Tagen näherte sich die Zellzyklusverteilung in den bestrahlten und unbestrahlten Zellen an.

### 3.1.4 Klonogenes Überleben humaner Osteoblasten

Neben der Untersuchung der Proliferation nach Bestrahlung ist die Bestimmung von klonogenem Überleben ein wichtiger Parameter, um die Fähigkeit der Zellen zur Zellteilung und Koloniebildung nach Bestrahlung zu bewerten. Die Auswertung im Rahmen dieser Arbeit ergab, dass Osteoblasten mit zunehmender Dosis geringere Koloniebildungsfähigkeit aufweisen (siehe Abb.3.5). Zusätzlich wurde die Auswirkung einer höheren Passagenanzahl, die einem höheren Differenzierungsgrad entspricht, untersucht. Es wurde festgestellt, dass die Zellen mit höherer Passagenzahl strahlenreistenter sind. Während in Zellen, die in der ersten Passage (P1) mit 1 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt wurden, die Koloniebildungsfähigkeit auf 29% sank konnten bestrahlte Zellen in Passage drei (P3) noch zu 64% Kolonien ausbilden.

### 3.1.5 Genexpression der Differenzierungsmarker in Osteoblasten

Die Differenzierung von Zellen ist allgemein an die Expression und Aktivität bestimmter Proteine gekoppelt. So ist die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren RUNX2 und Osterix für die Differenzierung von unreifen Osteoblasten zu reifen, matrixbildenden Osteoblasten

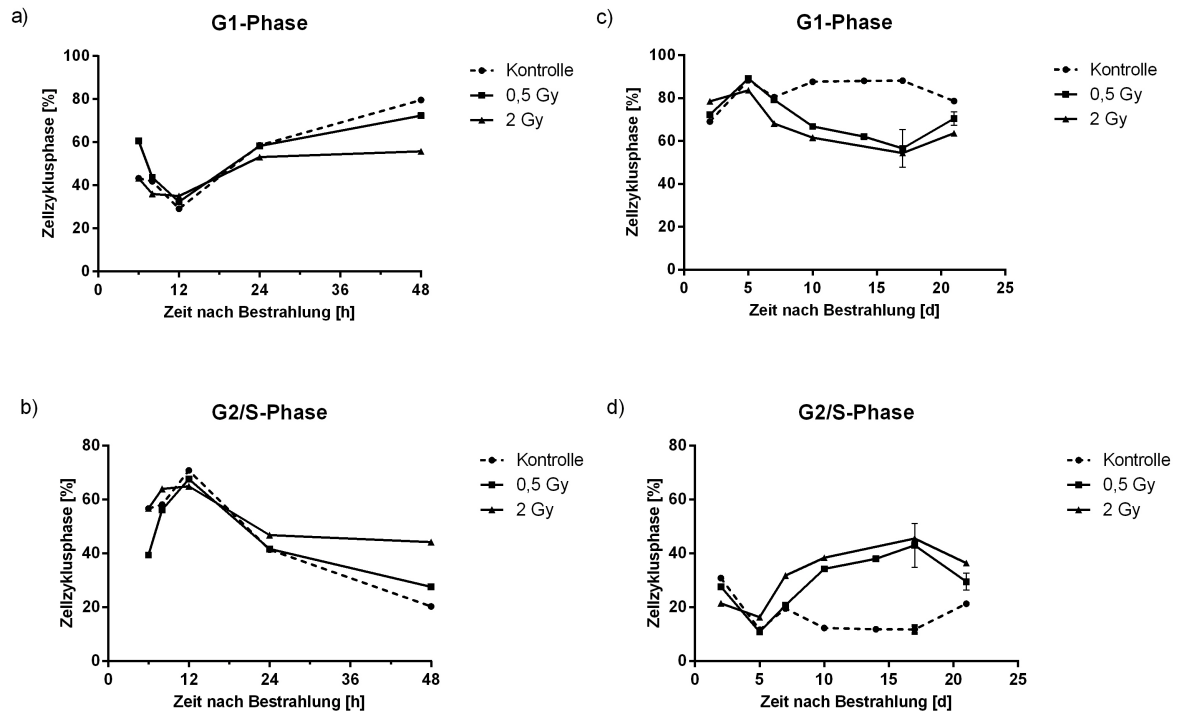


Abbildung 3.4: Zellzyklusverteilung in humanen primären Osteoblasten nach Röntgenbestrahlung. Osteoblasten wurden mit 0,5 und 2 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt und die Zellzyklusverteilung durchflusszytometrisch 3-48 Stunden (a,b) sowie 3-21 Tage (c,d) nach Bestrahlung bestimmt.

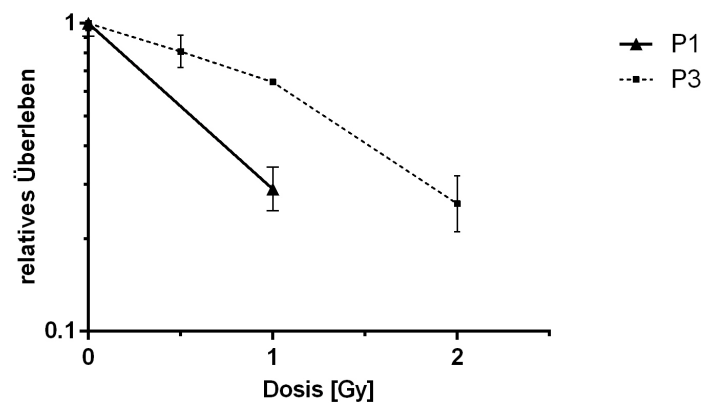


Abbildung 3.5: Klonogenes Überleben der bestrahlten Osteoblasten. Die Osteoblasten in Passage 1 (P1) und Passage 3 (P3) wurden mit 0,5, 1 und 2 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt und deren Koloniebildungsfähigkeit nach 14 Tagen ausgewertet. N=1, n=3. Mittelwert, SD.

notwendig [13, 156]. Bonesialoprotein (BSP) und Osteocalcin (OCN) sind für den Aufbau einer mineralisierten Matrix verantwortlich [157, 158]. Die Differenzierung und Reifung von Osteoklasten wird von RANKL (Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand), ein Faktor der von Osteoblasten exprimiert wird, gesteuert [159]. Antagonist zur RANKL ist Osteoprotegerin (OPG), das ebenfalls von Osteoblasten exprimiert wird und dient der Regulation der Osteoklastogenese, indem es an RANKL bindet und damit die Reifung von Osteoklasten unterdrückt [27].

Hier wurde untersucht, ob die Expression von Differenzierungsmarkern durch Bestrahlung beeinflusst wird. Dazu wurde die Genexpression der Osteoblastenmarker RUNX2, Osterix, RANKL, OPG sowie BSP und OCN nach Bestrahlung mit 0.5, 2 und 10 Gy Röntgenstrahlung untersucht.

Wie in Abb.3.6 dargestellt, steigt im Vergleich zur unbestrahlten Kontrollen die Expression von RUNX2 24h nach Bestrahlung an, dabei ergibt sich für die Dosis von 0.5 Gy der deutlichste Effekt ( $RQ=2,97\pm1,57$ ). Hingegen änderte sich die Expression des Transkriptionsfaktors Osterix nach Bestrahlung nicht. Die Expression der Proteine, welche für den Aufbau des Knochenmatrixes notwendig sind, BSP und Osteocalcin (OCN), war nach Bestrahlung im Vergleich zur Kontrolle erhöht (siehe Abb.3.6). Die BSP-Expression ist am deutlichsten durch 0.5 Gy Röntgenstrahlung beeinflusst ( $RQ=5,1\pm3,8$ ), für höhere Dosen ist der Effekt ähnlich. Die Expression des Osteocalcins ist nach 10 Gy Röntgen erhöht ( $RQ=8,4\pm5,9$ ) sowie nach 2 Gy ( $RQ=2,4\pm1,2$ ) und 0.5 Gy ( $RQ=3,7\pm1,8$ ). RANKL und OPG sind wichtige Faktoren für Osteoklastogenese und somit für den Knochenumbau. Die Expression von RANKL und OPG zeigt keine Veränderung nach Bestrahlung. Die Ausnahme bildet die Expression von RANKL nach einer Bestrahlung mit 10 Gy Röntgenstrahlung ( $RQ=1,77\pm0,79$ ), die jedoch nicht signifikant unterschiedlich ist.

### 3.1.6 Expression der alkalischen Phosphatase und $Ca^{2+}$ -Inkorporation in Osteoblasten

Der Knochen besteht bis zu 70% aus Phosphat und Mineralien, welche dem Knochen seine Festigkeit verleihen [160]. Phosphate und Hydroxyapatite sowie  $Ca^{2+}$  werden hauptsächlich von Osteoblasten in die Knochenmatrix eingelagert. Dies geschieht zum einem mit Hilfe der alkalischen Phosphatase (ALP) und durch das direkte Freisetzen der  $Ca^{2+}$ -Versikel [161, 162]. Die ALP-Konzentration und  $Ca^{2+}$ -Einlagerungen zeigen die Aktivität der Osteoblasten und somit deren Funktionalität an. Um die Auswirkung von ionisierender Strahlung auf die Aktivität der Osteoblasten zu untersuchen, wurden beide Faktoren untersucht.

Die bestrahlten Osteoblasten wurden über die Kultivierungsdauer von 14 Tagen auf die Veränderungen der ALP-Konzentration untersucht. Die ALP-Konzentration zeigte keine signifikante Änderung in Abhängigkeit von der Dosis (0.5; 2 Gy Röntgenstrahlung) und Kultivierungsdauer (siehe Abb.3.7).

Die  $Ca^{2+}$ -Einlagerungen von Osteoblasten können mit Alizarin Red S gefärbt und anschließend durch Extraktion des Farbstoffes dessen Konzentration gemessen werden. Die  $Ca^{2+}$ -Einlagerungen nahmen im Laufe der Kultivierung der Zellen kontinuierlich zu und die



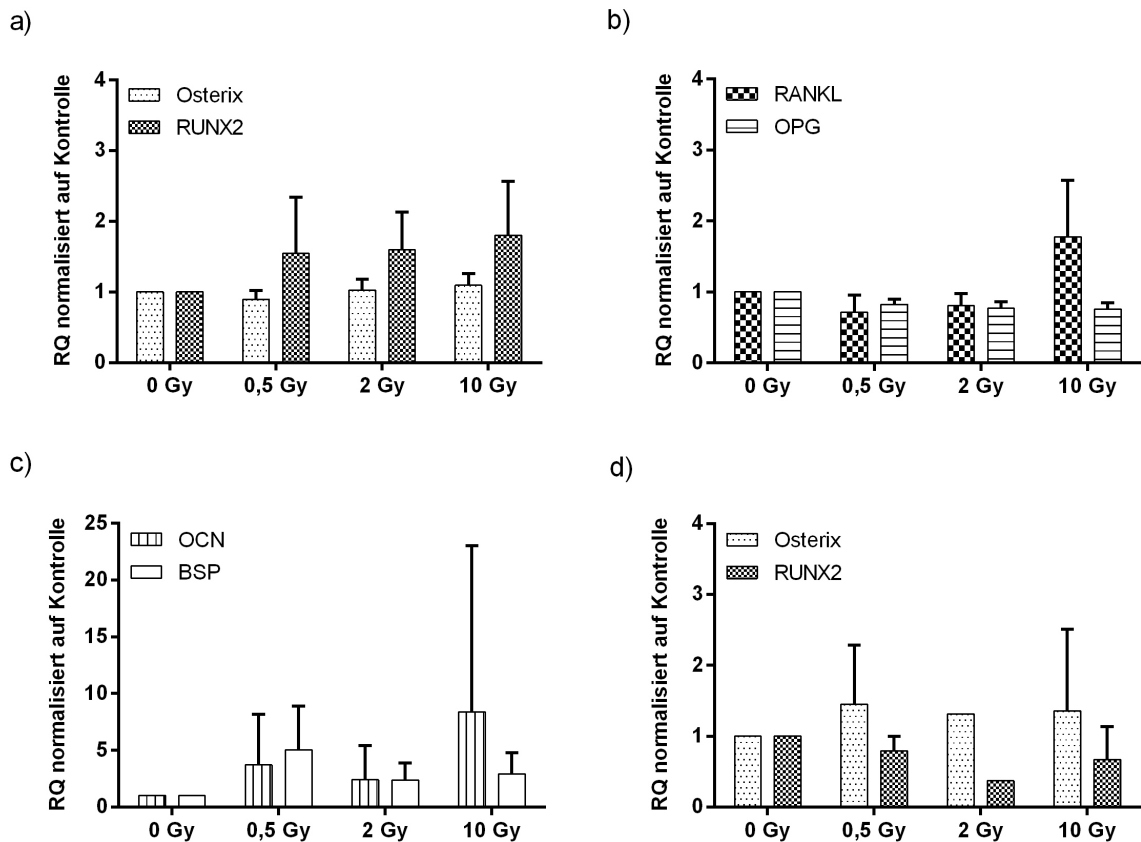


Abbildung 3.6: Relative Expression der Gene in humanen Osteoblasten nach Bestrahlung. Die Zellen wurden 24h (a-c) sowie 5d (d) nach Bestrahlung (0.5 Gy, 2 Gy und 10 Gy Röntgenstrahlung) für die Extraktion der RNA für qRT-PCR lysiert. Die Werte wurden auf unbestrahlte Zellen normiert und GAPDH als Referenzgen gemessen. N=3, n=6. Mittelwert, SEM.

Bestrahlung der Zellen (0.5; 2 Gy Röntgenstrahlung) bewirkte eine deutliche dosisabhängige Steigerung der  $\text{Ca}^{2+}$  ab Tag 10 (siehe Abb.3.8). Am Tag 14 der Kultivierung erreichten die Zellen sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der bestrahlten Proben das Maximum, danach folgte eine Abnahme der gemessenen Konzentration. Die Zunahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einlagerungen in den bestrahlten Zellen betrug für 0.5 Gy 20% und für 2 Gy 40% in Vergleich zur Kontrollgruppe.

### 3.1.7 Bestimmung von für den Knochenmetabolismus relevanten Zytokinen

Der Knochenmetabolismus wird durch die Freisetzung von Zytokinen von verschiedenen untereinander interagierenden Zellen gesteuert. Osteoblasten regulieren die Osteoklastogenese durch das RANKL/OPG-Verhältnis sowie den Aufbau der Knochenmatrixes durch OCN. Die

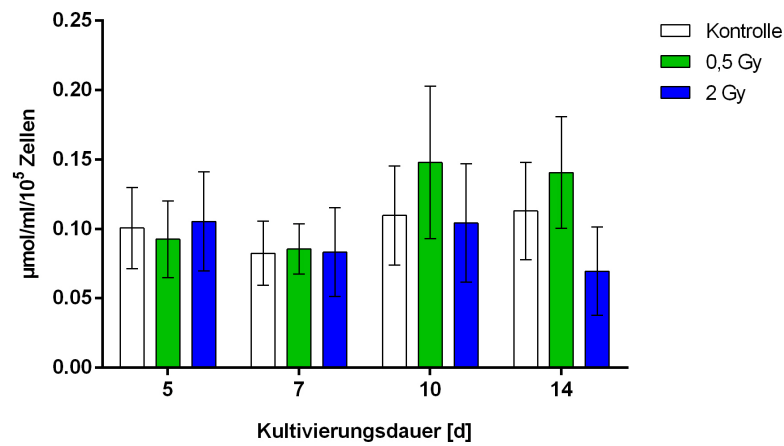


Abbildung 3.7: Veränderung der alkalischen Phosphatase-Konzentration (ALP) in bestrahlten Osteoblasten. Die Osteoblasten wurden mit 0.5 und 2 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt und anschließend die Konzentration der ALP über 14 Tage bestimmt. N=6; Mittelwert, SEM.

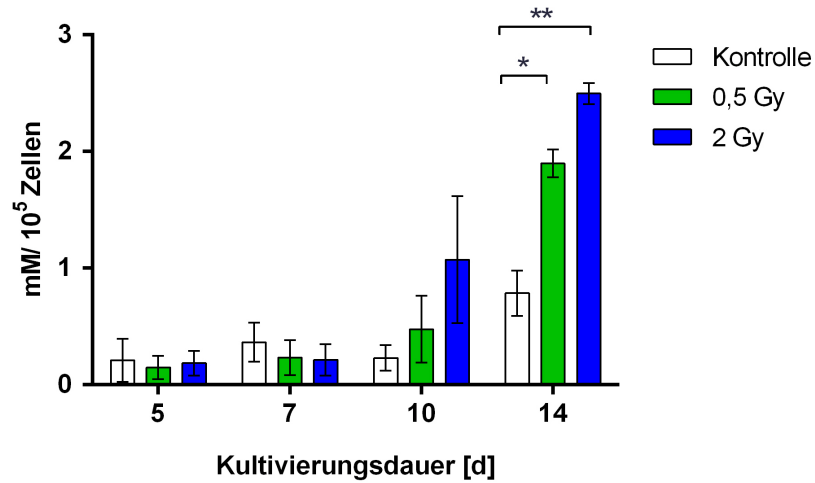


Abbildung 3.8: Ca<sup>2+</sup>-Einlagerungen in bestrahlten Osteoblasten. Die Osteoblasten wurden mit 0.5 und 2 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt und die Calcium-Einlagerungen wurden mittels Alizarin Red S über die Kultivierungsdauer photometrisch bestimmt. N=3, n=3. Mittelwert, SEM. Statistik mit student-t-test ( $p < 0.05$ ), P-Werte: Kontrolle vs 0.5 Gy \* $p=0,0280$ , für Kontrolle vs 2 Gy \*\* $p=0.0080$

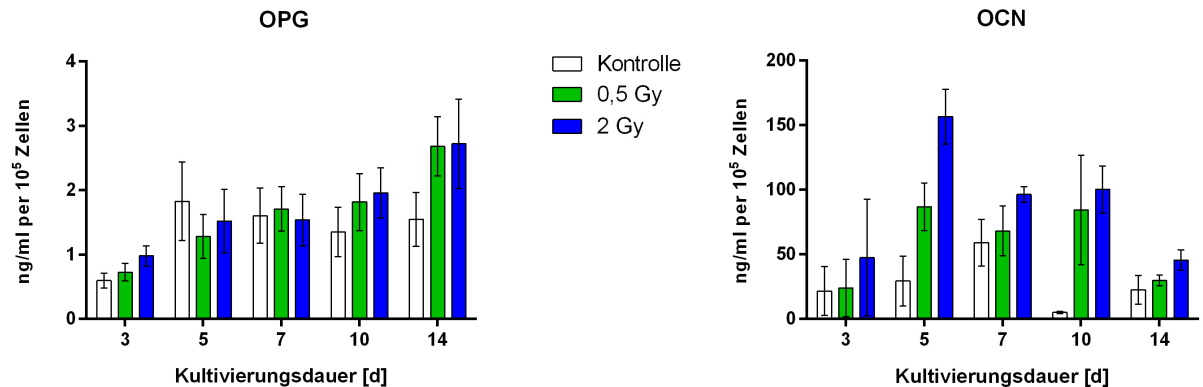


Abbildung 3.9: Zytokinfreisetzung humaner Osteoblasten nach Bestrahlung. Osteoblasten wurden mit 0.5 und 2 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt und die Konzentration von OPG oder OCN im Zellkulturüberstand bestimmt. OPG: Mittelwert, SEM, N=6, n=14; OCN: Mittelwert mit SEM, N=3, n=6

Experimente in Rahmen dieser Arbeit hatten zum Ziel strahleninduzierte Veränderungen der Freisetzung der Faktoren, die für den Knochenmetabolismus relevant sind, zu untersuchen. Wie in der Abb.3.9 dargestellt, erreicht die OPG-Konzentration im Zellkulturüberstand der unbehandelten Zellen bereits nach fünf Tagen ein Maximum und nimmt anschließend kontinuierlich ab. Die bestrahlten Zellen mit 0.5 und 2 Gy Röntgenstrahlung setzen über die Kultivierungszeit OPG frei, dabei ist die OPG-Konzentration nach 14 Tagen nach Bestrahlung deutlich höher als in den Kontrollproben.

Die Freisetzung von OCN verhält sich ähnlich, ein Maximum ist fünf Tage nach Bestrahlung bereits erreicht, jedoch weisen die Kontrollzellen stets niedrigere OCN-Level als die bestrahlten Zellen im Zellkulturüberstand auf.

### 3.2 Einfluss von Strahlung auf die Differenzierung humaner Osteoklasten

Osteoklasten sind knochenresorbierende Zellen. Sie spielen bei entzündlichen Knochenerkrankungen eine entscheidende Rolle, indem sie durch Freisetzung von Proteasen zum Knochenabbau beitragen [163]. Die Vorläuferzellen werden in ihrer Differenzierung weitgehend von den umliegenden Zellen durch Zytokinfreisetzung oder direkten Zell-Zell Kontakt beeinflusst [47, 164]. Der Ursprung von Osteoklasten sind hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen (HSPC), die im Knochenmark zu monozytären Vorläuferzellen differenzieren, oder aus dem Knochenmark austreten und sich im peripheren Blut zu Monozyten weiterentwickeln [165–167]. In Patienten wird nach Strahlentherapie (Gesamtdosis 40-60 Gy) ein Knochenabbau beobachtet, der mit strahleninduzierten Schäden in Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten in Verbindung gebracht wird [168]. Die Auswirkungen einer Niedrig-Dosis Therapie auf die Entwicklung und die Aktivität von Osteoklasten wurden bisher nicht untersucht.

In diesem Abschnitt der Arbeit wurde der Einfluss von ionisierender Strahlung auf die Differenzierung von Osteoklasten aus Monozyten untersucht.

### 3.2.1 Apoptose in Monozyten

Die Monozyten kommen als Vorläuferzellen der Osteoklasten im entzündeten Gelenkspalt der RA-Erkrankten vor und stellen ein potentiell Target der Bestrahlung in Rahmen der Therapie dar. Deshalb wurde im ersten Schritt die Strahlensensitivität der Monozyten durch Bestimmung der Apoptoserate untersucht.

Die Messungen von Annexin V/PI mittels Durchflusszytometrie haben ergeben, dass in Kontrollzellen die Apoptoserate zwischen 2% und 8% schwankt. Weiterhin ergibt sich nach 12 Stunden eine signifikant höhere Apoptoserate für die bestrahlten Zellen, die aber den Maximalwert der Kontrollen nicht übersteigt. Solche Apoptosenraten sind in den Blutzellen wie z.B. in unbestrahlten T-Zellen üblich [169].

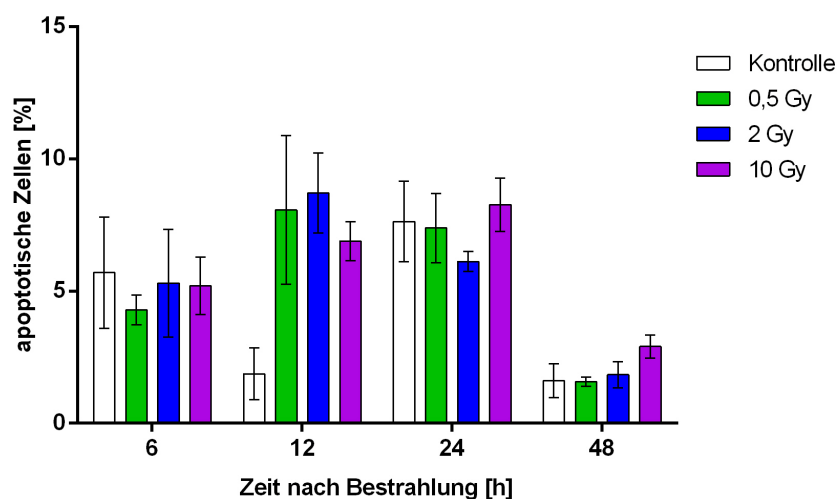


Abbildung 3.10: Apoptose in Osteoklastenvorläuferzellen. Osteoklasten-Vorläuferzellen (Monozyten) wurden nach Absetzen mit 0.5, 2 und 10 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt und anschließend im Differenzierungsmedium kultiviert. Die Apoptosemessung erfolgte mittels AnnexinV/PI-Färbung mit durchflusszytometrischen Messungen. AnnexinV+/PI- wurden dabei als apoptotisch gewertet. N=2, n=4. Mittelwert, SEM.

### 3.2.2 Differenzierung von Osteoklasten auf Plastik

Im Folgendem wurde die Differenzierung der Osteoklasten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung untersucht. Die Monozyten wurden wie im Abschnitt 2.1.4 beschrieben isoliert und mit 0.5, 2 und 10 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt. Die Versuche wurden zuerst in Zellkulturgefäßen aus Plastik durchgeführt. Während der 14 tätigen Kultivierung im Osteoklasten-Medium auf Plastik wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und die Anzahl der reifen Osteoklasten ausgewertet.

Es stellte sich heraus, dass die Bildung von Osteoklasten oszillierend verläuft (siehe Abb.3.11), wobei die Bestrahlung von Vorläuferzellen mit einer niedrigen und mittleren Dosis Röntgenstrahlung (0.5 und 2 Gy) kein Einfluss auf die Reifung der Osteoklasten hatte.

Da die Ausreifung von Osteoklasten über die Kultivierungsdauer nach 14 Tagen deutlich fortgeschritten ist, wurde der Zeitpunkt 14 Tage für weitere Experimente gewählt. Da für 0.5 Gy und 2 Gy keinen Einfluss von Strahlung beobachtet wurde, wurden weitere Experimente für eine hohe Dosis (10 Gy) durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Zahl der ausgereiften Osteoklasten niedriger als in den Kontrollzellen war (siehe Abb.3.12).

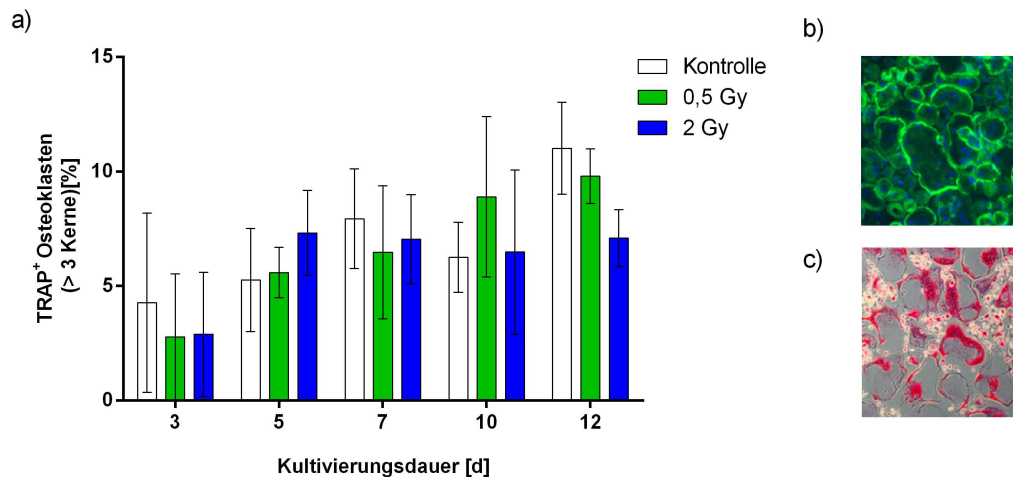


Abbildung 3.11: Anzahl ausdifferenzierter Osteoklasten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung. Vorläuferzellen wurden mit 0.5 und 2 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt und anschließend kultiviert. Die Zellen, die sowohl DAPI<sup>+</sup> als auch TRAP<sup>+</sup> waren mit mehr als 3 Kernen, wurden als Osteoklasten gewertet (a). F-Aktin und DAPI gefärbte Osteoklasten (b); TRAP-gefärbte Osteoklasten (c). N=3-6, n=12. Mittelwert, SEM.

### 3.2.3 Differenzierung der Osteoklasten auf Knochen

Da das natürliche physiologische Substrat für Osteoklasten der Knochen ist, wurde die Kultivierung von Osteoklasten und deren Vorläuferzellen auf Knochenstücken etabliert und Vergleichsexperimente zur Plastik-Oberfläche durchgeführt. Es wurde wie im Abschnitt 2.1.4 verfahren und anschließend die resorbierte Fläche pro Gesichtsfeld bestimmt.

Wie in der Abb.3.13 zu entnehmen, verringerte die Bestrahlung die Osteoklastenaktivität signifikant, im Vergleich zur Kontrolle ( $0,49 \pm 0,08$ ) und zwar nicht nur eine hohe ( $0,27 \pm 0,12$ ), sondern auch für eine mittlere und am deutlichsten für eine niedrige Dosis Röntgenstrahlung ( $0,23 \pm 0,18$ ). Während der Knochenresorption setzen Osteoklasten die abgebauten Kollagenfragmente ab, welche im Zellkulturüberstand gemessen werden können. Eine entsprechende Messung der Fragmente (CTX Crosslaps) ergab, dass es keinen Unterschied in der freigesetzten Menge der Kollagenfragmente zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen gab (siehe Abb.3.14). Das Ergebnis ist nicht eindeutig, da eine Spenderabhängigkeit vorlag und

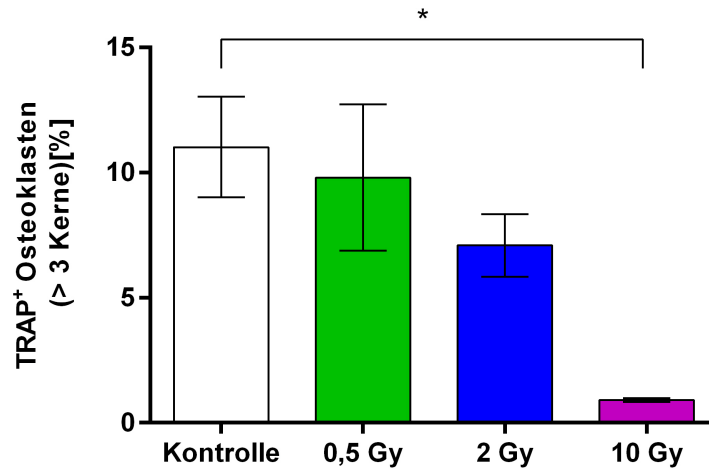


Abbildung 3.12: Anzahl ausdifferenzierter Osteoklasten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung nach 14 Tagen. Vorläuferzellen wurden mit 0,5, 2 und 10 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt und anschließend für 14 Tage kultiviert. Die Zellen, die sowohl DAPI<sup>+</sup> als auch TRAP<sup>+</sup> waren und mehr als 3 Kerne hatten, wurden nach 14 Tagen als Osteoklasten bestimmt. N=3, n=6. Mittelwert, SEM. Statistik: Mann Whitney Test mit  $p > 0,05$  (\* $p = 0,0238$ ).

die gemessene Werte zwischen den Spendern sich unterschieden. Die Messung bezieht sich aber nur auf die Aktivität der Zellen in den letzten 3 Tagen der Kultivierung, da während der Kultivierungsdauer ein Mediumswechsel alle 3 Tage erfolgte.

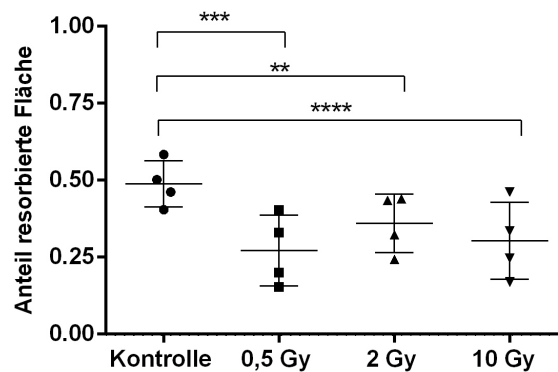


Abbildung 3.13: Resorbierte Fläche durch bestrahlte Osteoklasten. Vorläuferzellen wurden mit 0,5, 2 und 10 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt und für 21 Tage auf den Knochenplättchen im Differenzierungsmedium kultiviert. Die Auswertung der resorbierten Fläche erfolgte mittels Image J Software. N=2, n=4. Mittelwert, SD. Statistik mit student t-test ( $p < 0,05$ ), P-Werte: Kontrolle vs 0,5 Gy \*\*\* $p = 0,0002$ ; Kontrolle vs 2 Gy \*\* $p = 0,0054$ ; Kontrolle vs 10 Gy \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

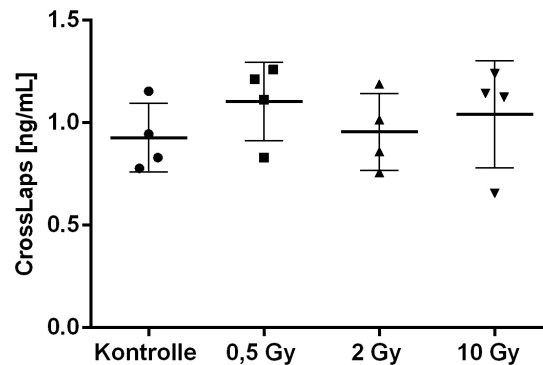


Abbildung 3.14: Konzentration der freigesetzten Kollagenfragmente (CrossLaps, CTX) der bestrahlten Osteoklasten nach 21 Tagen. Osteoklasten-Vorläuferzellen wurden mit 0,5, 2 und 10 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt und anschließend auf Knochenplättchen für 21 Tage kultiviert. Der Mediumswechsel erfolgte alle drei Tage. Die gemessene Werte beziehen sich auf die Aktivität im Zeitraum zwischen 18-21 Tag nach Bestrahlung. N=2, n=4. Mittelwert, SEM.

### 3.2.4 Proteinexpression humaner Osteoklasten nach Bestrahlung

Neben der Anzahl an neugebildeten Osteoklasten nach Röntgenbestrahlung wurde ebenfalls die Expression spezifischer Proteine, die an der Differenzierung und Aktivität von Osteoklasten beteiligt sind, überprüft.

Dazu wurde die Expression der Proteine Cathepsin K, TRAP, c-Src, und TRAF6 im Western Blot untersucht. Cathepsin K (39 kDa) ist eine von Osteoklasten spezifisch sekretierte Protease, die für den Abbau von organischen Bestandteilen des Knochens verantwortlich ist und somit Rückschlüsse auf die resorbierende Aktivität der Zellen gibt [163]. TRAP ist eine Phosphatase und neben Cathepsin K ein wichtiger Marker für die Funktionalität der Osteoklasten. Die c-Src Kinase (60 kDa) ist für die intrazelluläre Verankerung der Zell-Matrix-Verbindungsproteine  $\alpha v \beta 3$  und RANK verantwortlich, die sich auf der Zelloberfläche befinden und die Anheftung der Zellen an die extrazelluläre Matrix ermöglichen [170, 171]. Bei TRAF6 (60 kDa) handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der an der Signaltransduktion bei der Aktivierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen und der Knochenresorption beteiligt ist [172].

Zusammenfassend ist anzumerken, dass die Bestrahlung der Vorläuferzellen von Osteoklasten mit einer niedrigen Dosis keinen signifikanten Effekt auf die Expression von c-Src, Cathepsin K, TRAP und TRAF6 in den differenzierten Zellen hatte. Wie in der Abb.3.16 a) dargestellt, wurde die Proteinexpression von c-Src durch Bestrahlung mit 2 und 10 Gy vermindert, nicht aber für 0,5 Gy Röntgenstrahlung. Für eine mittlere und hohe Dosis ergab sich eine Abnahme von c-Src, Cathepsin K und TRAF6 aber eine Abnahme von TRAP.

Um aufzuklären, ob Bestrahlung eine andere Wirkung in Abhängigkeit von Reife der Osteoklasten hat, wurden im nächsten Schritt reife Osteoklasten bestrahlt. Dazu wurden Zellen nach 10 Tagen im Differenzierungsmedium mit 0,5, 2 und 10 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt und weiterhin kultiviert. Nach 19 Tagen wurde die Proteinexpression detektiert. Wie der Abb.3.16 b) zu entnehmen, war die Expression von Cathepsin K und TRAP nach 2 und 10 Gy

niedriger als in den Kontrollzellen. Die Bestrahlung mit 0.5 Gy Röntgenstrahlung bewirkte nur eine Abnahme von TRAP, aber nicht von Cathepsin K. Das c-Src Protein zeigte eine starke Schwankung in Abhängigkeit vom Spender. Somit entsprechen die strahlungsabhängigen Änderungen der Expression von Cathepsin K und TRAP der Änderungen nach Bestrahlung der Vorläuferzellen, für c-Src wurde einer Abnahme der Expression in Vorläuferzellen eine Zunahme in reifen Osteoklasten festgestellt.



Abbildung 3.15: Proteinexpression in Osteoklasten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung. Vorläufer der Osteoklasten wurden mit 0.5, 2 und 10 Gy Röntgen am Tag der Aussaat bestrahlt und für 14 Tage in Differenzierungsmedium kultiviert. Die Auftragsmenge des Gesamtproteins ist 10 µg.

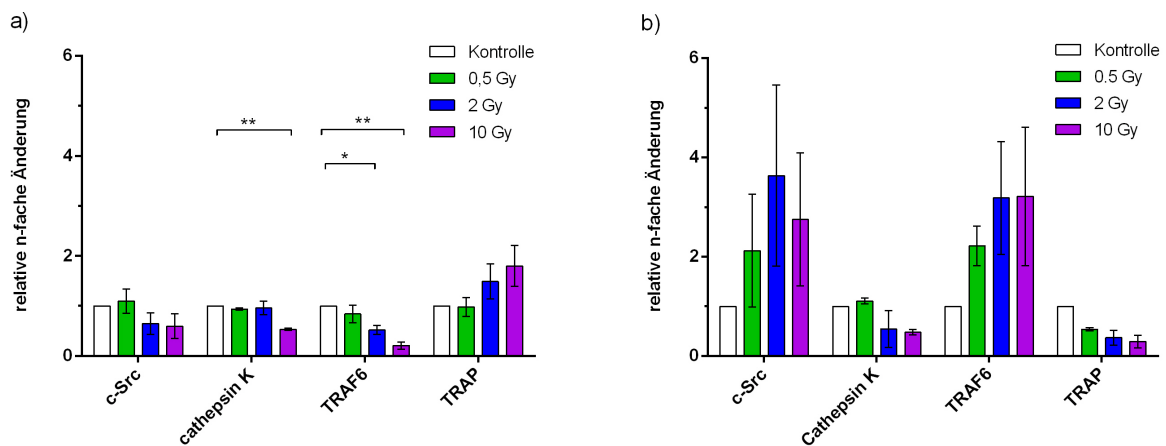


Abbildung 3.16: Quantifizierung der Proteinexpression in Osteoklasten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung. Proteinexpression in Osteoklasten 14 Tage (a) sowie 9 Tage (19 Tage differenziert) (b) nach Bestrahlung. Die Quantifizierung des Western Blots erfolgte mit Software Fusion FX. Der Signal von GAPDH wurde als Referenz verwendet und die Werte auf die unbestrahlte Kontrolle normiert. N=3, n=3. Mittelwert, SEM. Statistik mit Student t-Test ( $p < 0.05$ ), P-Werte: TRAF6: 10 Gy vs Kontrolle  $**p=0,0087$ ; 2 Gy vs Kontrolle  $*p=0,0326$ ; Cathepsin K: 10 Gy vs Kontrolle  $**p=0,0029$ .



### 3.2.5 Strahleninduzierte Freisetzung der tartratresistenten sauren Phosphatase von Osteoklasten

Der Knochenabbau erfolgt durch die Freisetzung von Enzymen wie Cathepsin K, sowie durch das Freisetzen von tartratresistenten sauren Phosphatase (TRAP) durch Osteoklasten. Da die TRAP-Freisetzung direkt mit der Osteoklasten-Aktivität korreliert [173], wurde in dieser Arbeit die Auswirkung von ionisierenden Strahlung auf die TRAP-Aktivität untersucht.

In Abb. 3.17 ist die spezifische TRAP-Aktivität der Osteoklasten über die Kultivierungsdauer von 14 Tagen dargestellt. Die TRAP-Aktivität oszilliert, steigt aber insgesamt leicht in den unbestrahlten Kontrollen über die Dauer der Kultivierung an. Ein Trend zu einer erhöhten Freisetzung umindest für eine hohe Röntgendosis zu erkennen.

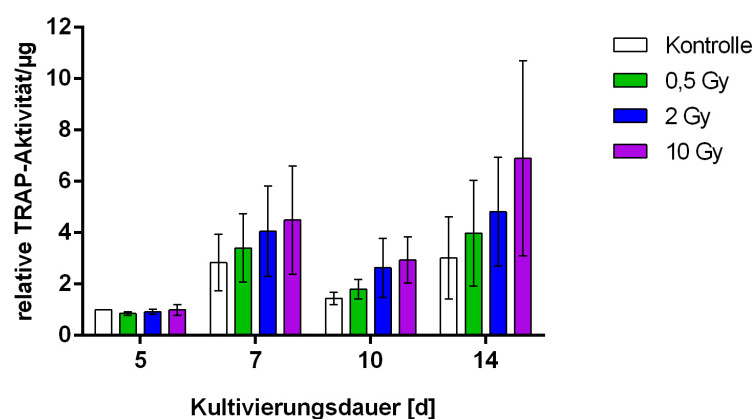


Abbildung 3.17: TRAP-Aktivität in Osteoklasten. Die TRAP-Aktivität wurde in Zellkulturüberständen von bestrahlten Osteoklasten (0.5, 2 und 10 Gy Röntgenstrahlung) gemessen. Die Messung erfolgte photometrisch bei 450nm, die Aktivität wurde auf Proteinmenge [ $\mu\text{g}$ ] bezogen und auf die Kontrolle am Tag 5 normiert. N=3. Mittelwert, SD.

## 3.3 Einfluss von Strahlung auf die Differenzierung von Th17 und Treg Zellen.

Rheumatoide Arthritis (RA) ist unter anderem durch das Einwandern von Immunzellen in den Gelenkspalt charakterisiert. Neben Monozyten spielen auch T-Zellen und deren Differenzierung in entzündungsfördernde Th17 und entzündungshemmende Treg Zellen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Erkrankung. Insbesondere gewinnen die IL-17-produzierenden Th17 Zellen immer mehr Beachtung, da sie durch Freisetzung von Zytokinen (IL-17, RANKL) erheblich zum Fortschreiten der RA beitragen [174, 175]. Als Antagonisten der entzündlichen Th17 gelten Treg Zellen, welche die Proliferation der entzündlichen Immunzellen unterdrücken. Während in der Krebstherapie insbesondere auf die Akkumulation der Treg Zellen im Tumorgewebe hingewiesen wird [176], was letztlich zur Immunsuppression führt, ist die Auswirkung von Niedrig-Dosis Therapie auf die Differenzierung von anti-inflammatorischen Treg Zellen nicht

bekannt.

In diesem Abschnitt der Arbeit wurde untersucht, wie ionisierende Strahlung die Proliferation und die Differenzierung von Th17 sowie von Treg Zellen aus CD4<sup>+</sup> Vorläuferzellen beeinflusst.

### 3.3.1 Differenzierung und Proliferation von Treg und Th17

Um den Einfluss einer Bestrahlung auf die Differenzierung und Proliferation von Th17 und Treg Zellen zu untersuchen, wurden CD4<sup>+</sup> Zellen wie im Abschnitt 2.1.3 beschrieben, kultiviert und mit 0.5, 2 und 10 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt.

Zunächst wurde die Gesamtzellzahl der bestrahlten Proben am Ende der Kultivierungszeit bestimmt, um die Auswirkung von Röntgenstrahlung auf die Proliferation der Zellen zu beurteilen. Wie in der Abb.3.18 dargestellt, verändert sich die Zellzahl unabhängig von Bestrahlungsdosis und Behandlung  $\pm$  TNF $\alpha$ /TGF $\beta$  nicht signifikant. Die Strahlensensitivität ist abhängig vom Spender, was somit eine breite Streuung bewirkt.

Der gemessene Anteil der Th17 Zellen nach 7 Tagen Kultivierungszeit (siehe Abb. 3.19 a))

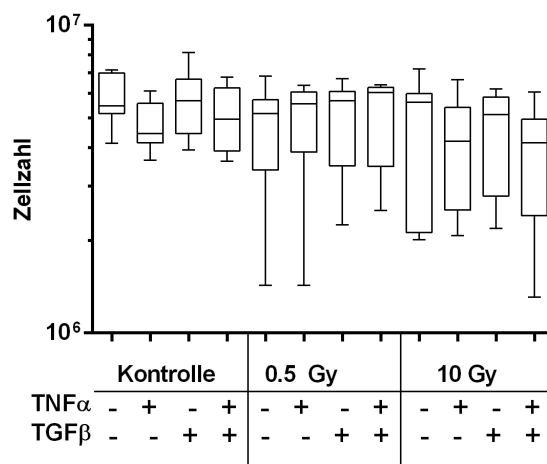


Abbildung 3.18: Zellzahlen der Lymphozyten nach Bestrahlung. Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit Röntgenstrahlung bestrahlt (0.5 und 10 Gy) und für 7 Tage im Differenzierungsmedium kultiviert. Die Behandlung mit TNF $\alpha$  [1ng/ml] und/oder TGF $\beta$  [1ng/ml] erfolgte in den aufgeführten Experimenten simultan. N=6, n=11. Mittelwert mit Min/Max.

deutet darauf hin, dass die Differenzierung der Zellen durch eine Bestrahlung nicht beeinflusst wird. Die unbestrahlten CD4<sup>+</sup> Vorläuferzellen (mean=2.6 $\pm$ 1,8) differenzieren im gleichen Maße wie nach Bestrahlung mit 0.5 Gy (mean=2.9 $\pm$ 2,3), mit 2 Gy (mean=2.8 $\pm$ 2,3) oder mit 10 Gy (mean=1,8 $\pm$ 1).

Hingegen zeigten die Treg Zellen ein anderes Verhalten, indem nach Bestrahlung mit einer hohen Dosis der Anteil an CD4<sup>+</sup>Fopx3<sup>+</sup> Zellen (10 Gy: mean=8.4 $\pm$ 1,9) in Vergleich zur Kontrolle (mean=4.0 $\pm$ 2,8) signifikant zunimmt. Die Bestrahlung mit 0.5 Gy und 2 Gy Röntgen hatte keinen Einfluss auf die Differenzierung der Treg Zellen.

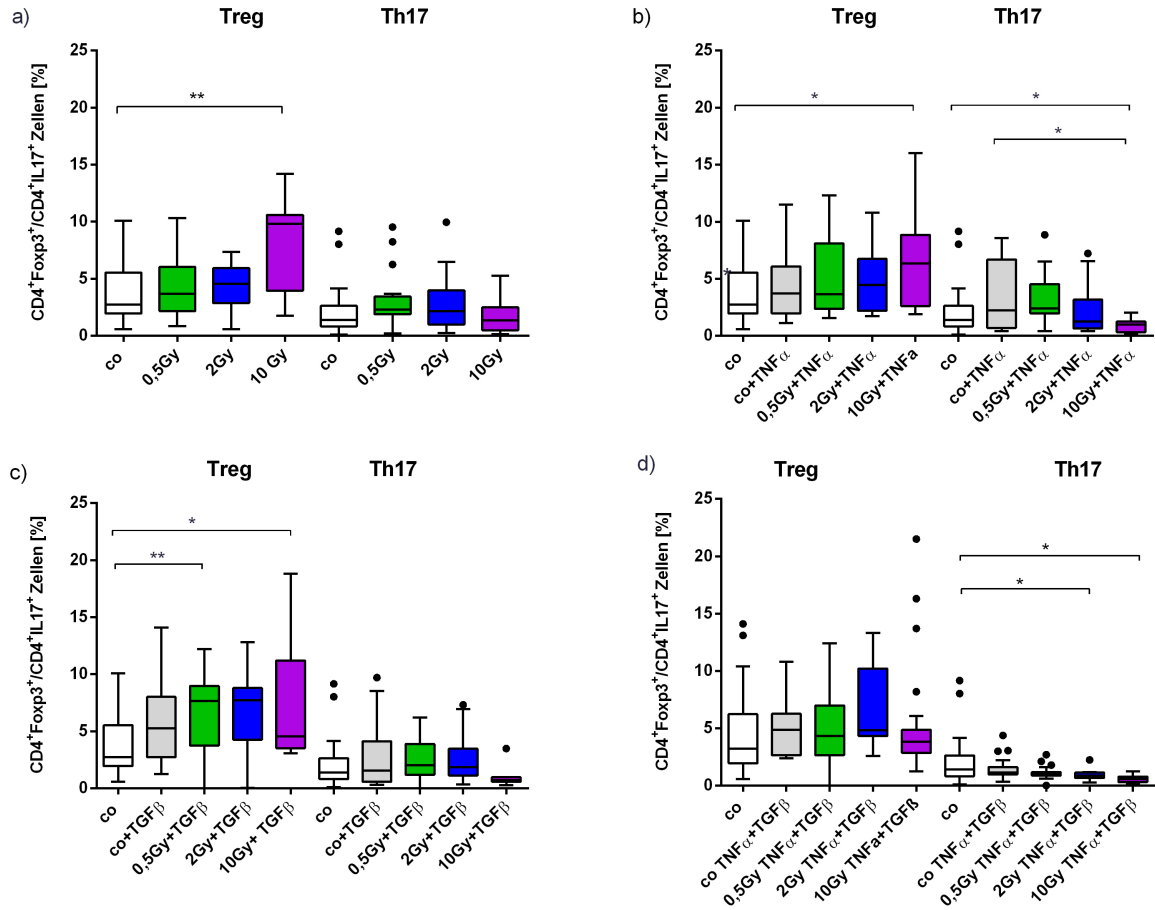


Abbildung 3.19: Differenzierung von Treg und Th17 Zellen nach Bestrahlung. Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit Röntgenstrahlung bestrahlt (0.5;2;10 Gy) und für 7 Tage im Differenzierungsmedium kultiviert (a). Die Behandlung mit TNF $\alpha$  [1ng/ml] (b) und/oder TGF $\beta$  [1ng/ml] (c, d) erfolgte in den aufgeführten Experimenten simultan. Anschließend erfolgte Immunfärbung mit anti-IL-17 und anti-Foxp3 und die durchflusszytometrische Messung. Als Th17 Zellen wurden Zellen mit positiven Markern für CD4 und IL17 (CD4<sup>+</sup>IL17<sup>+</sup>) identifiziert und für Treg Zellen mit positiven Markern für CD4 und Foxp3 (CD4<sup>+</sup>Fopx3<sup>+</sup>) festgelegt. Plot nach tukey, paired student t-test ( $p < 0.05$ ), P-Werte: a) \*\* $p=0.0033$ ,  $N=9$ ,  $n=18$ ; b) 10 Gy+TNFa vs co \* $p=0.0201$  und für 10 Gy+TNFa vs co+TNFa \* $p=0.0367$ ,  $N=9$ ,  $n=18$ ; c) 0.5 Gy+TGF $\beta$  vs co \*\* $p=0.0011$  und für 10 Gy+TGF $\beta$  vs co \* $p=0.0187$ ,  $N=10$ ,  $n=20$ ; d)  $N=11$ ,  $n=22$

### 3.3.2 Differenzierung der Immunzellen unter entzündlichen Bedingungen

Während einer chronisch-entzündlichen Erkrankung wie RA werden stets Entzündungsfaktoren, wie  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 und andere vermehrt nachgewiesen [177]. Diese führen zu einer entzündlichen Stimulation der Zellen und einer Reifung in entzündliche Zellen. In RA-Patienten wurde vermehrt ein erhöhter  $\text{TNF}\alpha$ -Gehalt im Serum nachgewiesen [178], so dass in den Experimenten im Rahmen dieser Arbeit durch die zusätzliche Stimulation der Zellen mit  $\text{TNF}\alpha$  das entzündliche Milieu nachgeahmt wurde. Im Gegensatz hierzu wurde anti-entzündliches  $\text{TGF}\beta$  in Patienten nach der Behandlung mit Radon festgestellt [179]. Da  $\text{TGF}\beta$  zusätzlich die Treg Differenzierung begünstigt [180, 181], wurde in dieser Arbeit untersucht, welchen Effekt die Bestrahlung in Gegenwart von  $\text{TGF}\beta$ -Zugabe auf die Entwicklung der Zellen hat.

Wie in Abb. 3.19 b) dargestellt, bewirkte die Strahlung in Kombination mit  $\text{TNF}\alpha$  keine deutliche Zunahme der Treg-Zellpopulation. Allerdings wurde ein deutlicher Rückgang der Th17-Zellen nach 10 Gy Bestrahlung in Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mit und ohne  $\text{TNF}\alpha$  gemessen. Somit hat  $\text{TNF}\alpha$  einen leicht inhibierenden Effekt in der Th17-Reifung bei einer hohen Dosis.

Im nächsten Schritt wurde die Wirkung von  $\text{TGF}\beta$  in Kombination mit einer Bestrahlung auf die Differenzierung der Th17/Treg Zellen untersucht (siehe Abb. 3.19 c). Die Zugabe von  $\text{TGF}\beta$  bewirkte sowohl eine Zunahme der Treg Zellen in unbestrahlten Zellen, als auch in bestrahlten Zellen. Die Bestrahlung mit 0.5, 2 und 10 Gy Röntgenstrahlung in Anwesenheit von  $\text{TGF}\beta$  erhöhte deutlich die Treg-Zellpopulation, hingegen blieb die Entwicklung der Th17 Zellen auch in Anwesenheit von  $\text{TGF}\beta$  und bei gleichzeitiger Bestrahlung unverändert. Nur eine hohe Dosis von 10 Gy wirkte inhibierend auf die Bildung von Th17 Zellen.

Während einer entzündlichen Erkrankung wird eine Vielzahl von inflammatorischen Faktoren freigesetzt, die zum Fortschreiten der Entzündung führen, falls diesen keine anti-inflammatorischen Signale wie z.B. durch  $\text{TGF}\beta$  entgegen wirken. Deshalb wurden im nachfolgenden Experiment  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{TGF}\beta$  zusammen eingesetzt und zusätzlich der Einfluss einer Bestrahlung untersucht. Die Bestrahlung bewirkte unter gleichzeitigem Einsatz von  $\text{TGF}\beta$  und  $\text{TNF}\alpha$  keinen signifikanten Anstieg von Treg Zellen, aber eine signifikante Abnahme von Th17 Zellen (siehe Abb. 3.20). Wenn man das Verhältnis von Treg zur Th17 Zellen bildet, wird jedoch ein Bestrahlungseffekt deutlicher, dass zumindest für die hohe Dosis Treg Zellen zunehmen bzw. Th17 Zellen abnehmen (siehe Abb. 3.20).

### 3.3.3 Bestimmung der Zytokinfreisetzung der differenzierten Zellen

Neben einer Bestimmung der Anteile von ausdifferenzierten Zellen ist deren Aktivität in Form von Freisetzung bestimmter Zytokine von großer Bedeutung. So setzten Treg Zellen vermehrt IL-10 frei während Th17 Zellen IL-17 sowie IL-22, 21 und  $\text{TNF}\alpha$  freisetzen.

Im Anschluss an die Bestimmung der Zellanteile wurde eine Messung der Zytokine in Mediumüberständen durchgeführt.

Die Messung der Überstände bestätigte größtenteils die durchflusszytometrische Analyse der Zellverteilung. In Proben mit  $\text{TNF}\alpha$  und 0.5 Gy wurde keine Veränderung bei der Freisetzung von IL-10 festgestellt, während nach 10 Gy Bestrahlung eine Abnahme von IL-10 detektiert wurde. Die Zugabe von  $\text{TNF}\alpha$  und/oder  $\text{TGF}\beta$  veränderte die Freisetzung von IL-10 nach Be-

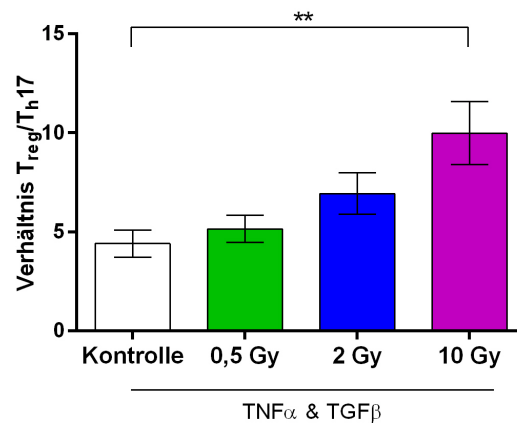


Abbildung 3.20: Verhältniss der differenzierten Treg und Th17 Zellen nach Bestrahlung unter TGF $\beta$ - und TNF $\alpha$ -Einwirkung. Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit Röntgenstrahlung bestrahlt (0.5;2;10 Gy) und für 7 Tage im Differenzierungsmedium mit 1 ng/ml TGF $\beta$  und 1 ng/ml TNF $\alpha$  kultiviert. Anschließend erfolgte Immunfärbung mit anti-IL-17 und anti-Foxp3 und die Messung am FACS. Als Th17 Zellen wurden Zellen mit CD4<sup>+</sup>IL17<sup>+</sup> identifiziert und für Treg CD4<sup>+</sup>Fopx3<sup>+</sup> Zellen festgelegt, anschließend Ergebnisse einzelner Spender in Verhältnis gesetzt (Treg:Th17). N=10, n=20. Mittelwert, SEM. Statistik mit Wilcoxon Test ( $p < 0.05$ ), P-Werte: 10 Gy vs Kontrolle \*\* $p=0,0028$

strahlung nicht (siehe Abb.3.21). Die Konzentration von IL-17 nahm unabhängig von Zugabe von TNF $\alpha$  oder TGF $\beta$  nach Bestrahlung mit 10 Gy Röntgenstrahlung ab. Die Bestrahlung mit niedriger Dosis von 0.5 Gy veränderte die Freisetzung von IL-17 nicht. Die Freisetzung von IL-21, IL-22 und TNF $\alpha$  wurde durch 0.5 Gy nicht signifikant verändert, jedoch wurde in mit 10 Gy bestrahlten Proben unabhängig von Zugabe von TNF $\alpha$  oder TGF $\beta$  eine Zunahme der Zytokine gemessen (siehe Abb.3.22).

In der Kultur entwickelten sich nicht nur Th17 oder Treg Zellen, sondern auch potentiell andere Subtypen wie Th1 oder Th2 T-Zellen, welche wiederum durch Freisetzung von IL-2, IL-4 oder INF $\gamma$  die Differenzierung beeinflussen können. Die Differenzierung von Th17 Zellen kann durch IL-2 inhibiert werden, während die Proliferation und Diffenzierung von Treg Zellen durch IL-2 gesteigert wird. Die Messung von IL-2 und IL-4 in Überständen zeigte, dass Bestrahlung mit 0.5 Gy keinen Effekt auf die Freisetzung dieser Zytokine hatte. Dennoch wurde in mit 10 Gy bestrahlten Proben unabhängig von TNF $\alpha$  und/oder TGF $\beta$  Zugabe eine 6 fache Zunahme der IL-2 Konzentration sowie ein Trend zur Zunahme von IL-4 gemessen (siehe Abb.3.23).

Zusammengefasste Ergebnisse zur Zytokinfreisetzung sind schematisch in der Tab.3.1 dargestellt.

### 3.4 Untersuchungen zu der Patientenstudie RADON

In der Patientenstudie zur Radonbehandlung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen wurden Patienten für 3 Wochen mit Radon behandelt. Der klinische Erfolg wurde durch

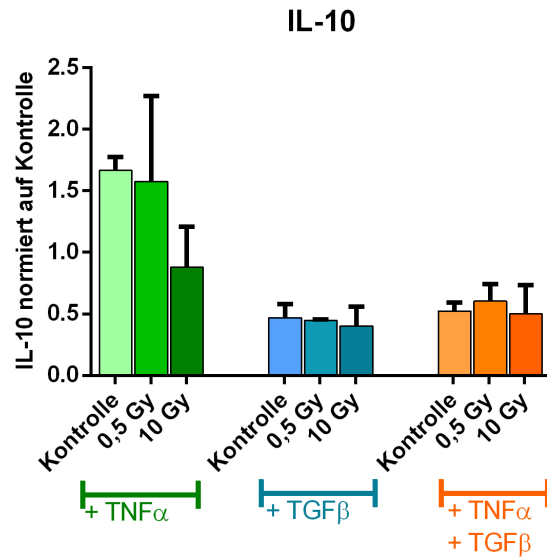


Abbildung 3.21: Freisetzung von IL-10 in bestrahlten CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit Röntgenstrahlung bestrahlt (0.5 und 10 Gy) und für 7 Tage im Differenzierungsmedium mit 1 ng/ml TGF $\beta$  und 1 ng/ml TNF $\alpha$  kultiviert. Anschließend erfolgte Messung der Zytokine mit Fluoreszenz-basierten Bead Immunoassay. Die Konzentration ist auf Zellkulturüberstand der unbestrahlten Zellen ohne TGF $\beta$  und TNF $\alpha$  normiert. N=3, n=6. Mittelwert, SD.

Tabelle 3.1: Einwirkung von Röntgenbestrahlung auf die Freisetzung der Zytokine der Th17/Treg Zellkultur.

T-Zellen	freigesetztes Zytokin	Dosis (Gy) und Stimulation		
		TNF $\alpha$ 0 0.5 10	TGF $\beta$ 0 0.5 10	TNF $\alpha$ + TGF $\beta$ 0 0.5 10
Treg	IL-10	↑ ↔ ↓	↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓
Th17	IL-17	↑ ↑ ↓	↕ ↕ ↓	↕ ↕ ↓
	IL-21	↕ ↕ ↕	↕ ↕ ↕	↕ ↕ ↕
	IL-22	↑ ↕ ↓	↓ ↓ ↕	↕ ↓ ↑
	TNF $\alpha$	↑ ↕ ↑	↕ ↕ ↑	↕ ↕ ↑
Th	IL-2	↑ ↕ ↑	↑ ↑ ↑	↑ ↑ ↑
	IL-4	↑ ↕ ↑	↕ ↕ ↑	↕ ↕ ↑
Zunahme (↑), Abnahme (↓), keine Veränderung (↔)				

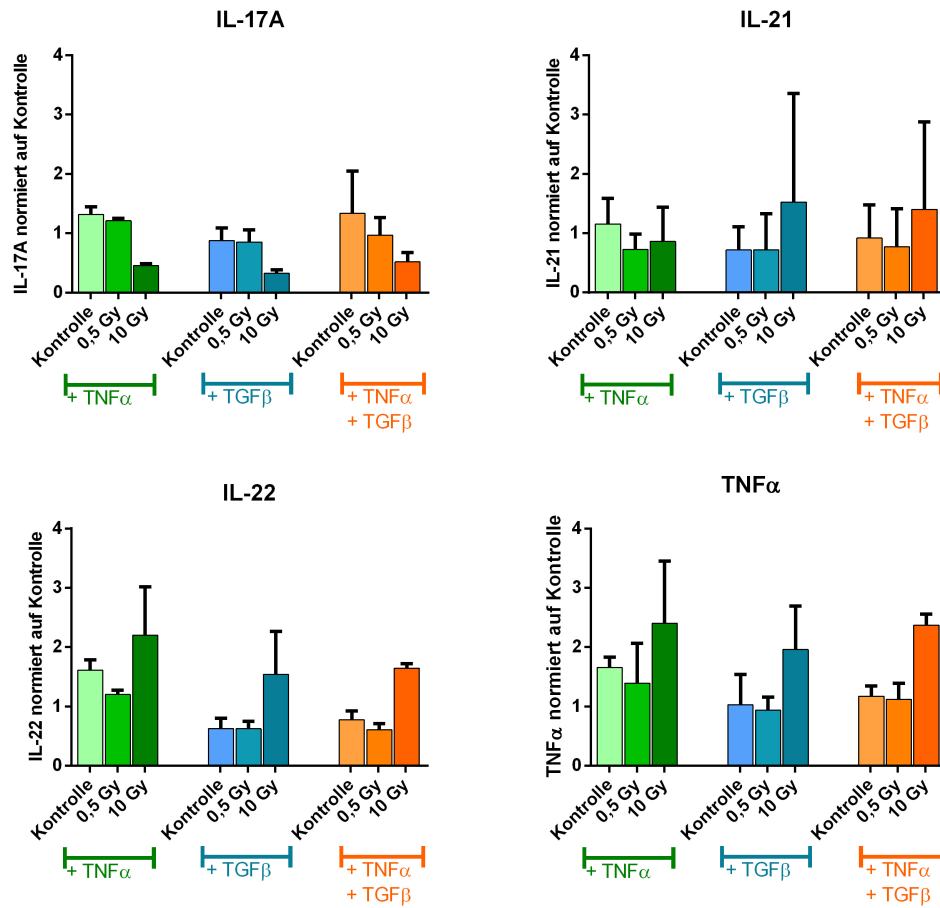


Abbildung 3.22: Freisetzung von Th17-spezifischen Zytokinen in bestrahlten  $CD4^+$  T-Zellen. Die  $CD4^+$  T-Zellen wurden mit Röntgenstrahlung bestrahlt (0.5 und 10 Gy) und für 7 Tage im Differenzierungsmedium mit 1 ng/ml  $TGF\beta$  und 1 ng/ml  $TNF\alpha$  kultiviert. Anschließend erfolgte Messung der Zytokine mit Fluoreszenz-basierten Bead Immunoassay. Die Konzentration ist auf Zellkulturüberstand der unbestrahlten Zellen ohne  $TGF\beta$  und  $TNF\alpha$  normiert. N=3, n=6. Mittelwert, SD.



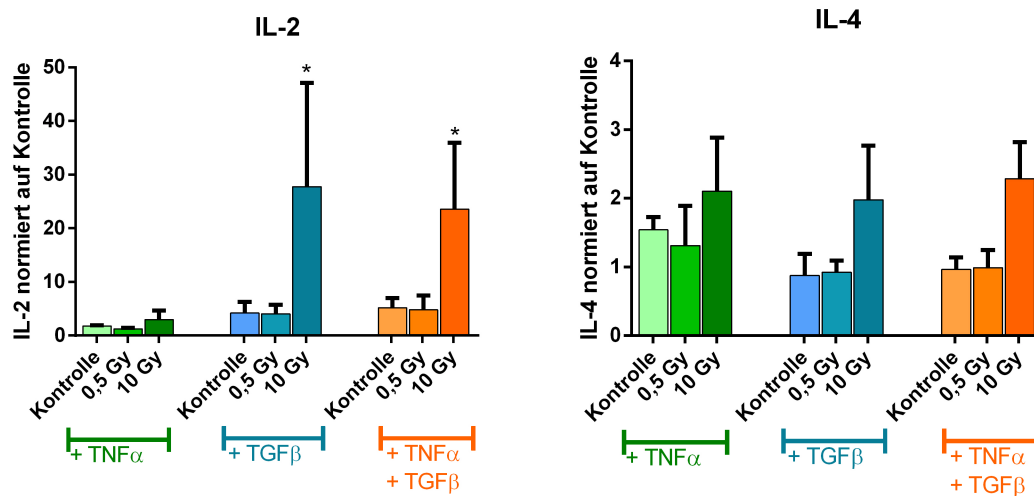


Abbildung 3.23: Freisetzung von IL-2 und IL-4 in bestrahlten CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit Röntgenstrahlung bestrahlt (0.5 und 10 Gy) und für 7 Tage im Differenzierungsmedium mit 1 ng/ml TGF $\beta$  und 1 ng/ml TNF $\alpha$  kultiviert. Anschließend erfolgte Messung der Zytokine mit Fluoreszenz-basierten Bead Immunoassay. Die Konzentration ist auf Zellkulturüberstand der unbestrahlten Zellen ohne TGF $\beta$  und TNF $\alpha$  normiert. N=3, n=6. Mittelwert, SD. Statistik mit ANOVA-Test: \*p<0.5

Befragung durch den ärztlichen Leiter der Studie ermittelt. In diesem Abschnitt der Arbeit wurde die Verteilung von entzündlichen Th17 Zellen und die Toleranz-vermittelnden Treg Zellen und Entzündungsmarker in Patientenserum, das vor und nach Therapie entnommen wurde, untersucht.

### 3.4.1 Verteilung Th17 und Treg Zellen im peripheren Blut der Patienten

Die folgende Untersuchung des peripheren Blutes von Patienten vor und nach Radon-Therapie (1, 3, 5 und 7 Monate) sollte Aufschlüsse darüber geben, ob eine Radon Therapie einen Einfluss auf die Verteilung von Th17 und Treg Zellen hat. Die untersuchten Patientenproben deuten darauf hin, dass die Radonbehandlung sich insbesondere auf die Treg Population auswirkt (siehe Abb.3.24). Der Anstieg von Treg Zellen wurde über den Zeitraum von sieben Monaten beobachtet. Aufgrund der geringen Anzahl an Patienten vor Beginn der Therapie, beträgt die Signifikanz des Anstieges nach sieben Monaten nur \*p=0,0129. Auch der Vergleich von Treg Zellen zur gesunden Kontrollgruppe ergab einen signifikanten Unterschied zu den behandelten Patienten (\*\*p=0,0003).

Hingegen wurde in Th17 Zellpopulation keine Veränderungen vor und nach Therapie festgestellt (siehe Abb.3.24). Erst nach 7 Monaten wurde eine signifikante Abnahme der Th17 Zellpopulation gemessen (\*\*\*\*p<0,0001) Die gesunde Kontrollgruppe weist vergleichbare Werte der Th17 Zellen (gesund: 0,83±0,16 vs vor Therapie: 0,65±0,22) auf.

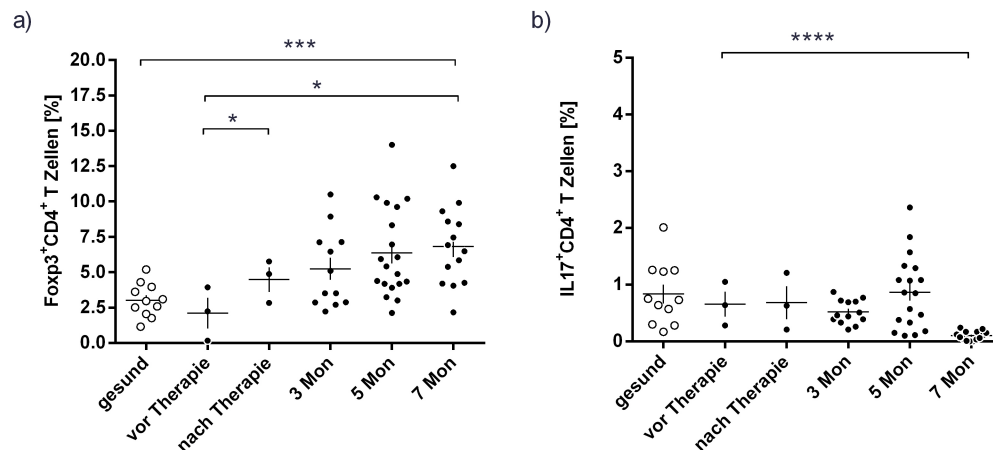


Abbildung 3.24: Die durchflusszytometrische Messung der Treg (a) und Th17 (b) Zellen erfolgte 24h nach Blutabnahme. Die Färbung der Zellen erfolgte mit anti-CD4 (PE) und anti-Fokp3 (APC) sowie anti-IL17 (FITC). N=3-19. Mittelwert, SEM. Statistik mit paired t-test, ( $p < 0.05$ ), P-Werte: Treg: vor vs. 7 Monate nach Therapie  $*p=0,0129$ ; gesund vs. 7 Monate nach Therapie  $***p=0,0003$ ; Th17: vor vs. 7 Monate nach Therapie  $****p<0,0001$ .

### 3.4.2 Zytokinbestimmungen im peripheren Blut

Chronisch-entzündliche Erkrankungen der Gelenke lassen sich anhand von Entzündungsmarkern im Serum der Patienten feststellen. Dazu werden in der Klinik verschiedene Parameter, welche der Klassifikationskriterien der American College for Rheumatology (ACR) und die European League Against Rheumatism (EULAR) entsprechen, herangezogen. In Rahmen dieser Arbeit wurden die Werte für BAP (knochenspezifische alkalische Phosphatase), CrossLaps, RANKL und OPG in Serum der Patienten bestimmt.

Die BAP ist ein Enzym der Zink-Metalloprotein Familie, welches die Phosphatgruppe von anorganischen Phosphatester abspaltet. Das Enzym wird von Osteoblasten synthetisiert und in die Umgebung freigesetzt. Die Konzentration von BAP in Serum spiegelt die Osteoblastenaktivität und somit den Knochenaufbau wieder [182].

CrossLaps sind lineare Abbaufragmente der C-terminalen Teloptide ( $\beta$ -CTx) des Typ I Kollagens. Die in den C-terminalen Telozeptiden vorkommende  $\alpha$ -Asparaginsäure wird bei Alterung des Knochens in  $\beta$ -Asparaginsäure umgewandelt ( $\beta$ -CTx). Quervernetzte Bruchstücke des  $\beta$ -CTx enthalten zweimal das  $\beta$ -CTx-Antigen. Diese Bruchstücke,  $\beta$ -CrossLaps genannt, werden durch Knochenresorption infolge der Osteoklasten-Aktivität freigesetzt.

RANKL ist für die Differenzierung von Osteoklasten erforderlich, während OPG die Differenzierung inhibiert. Das Verhältnis von OPG zu RANKL gibt Hinweise auf den Knochenumsatz, so ist ein hoher OPG/RANKL-Wert ein Anzeichen für Knochenbildung bzw. Inhibition der Osteoklastogenese.

Wie in der Abb.3.25 zu sehen ist, sind die BAP-Werte vor und in den Monaten nach Therapie unverändert. Hingegen sinken die Werte von CrossLaps in den Monaten nach Therapie signifi-

kant. Dabei sind die Werte direkt nach Abschluss der Therapie noch unverändert, sinken aber nach 3 Monaten deutlich. Der Effekt bleibt auch nach sieben Monaten bestehen.

RANKL-Konzentration im Serum verändert sich nicht nach der Therapie, obwohl die OPG Werte deutlich sinken. Dies führt dazu, dass das OPG/RANKL Verhältnis nach Abschluss der Therapie sinkt (siehe Abb.3.25).

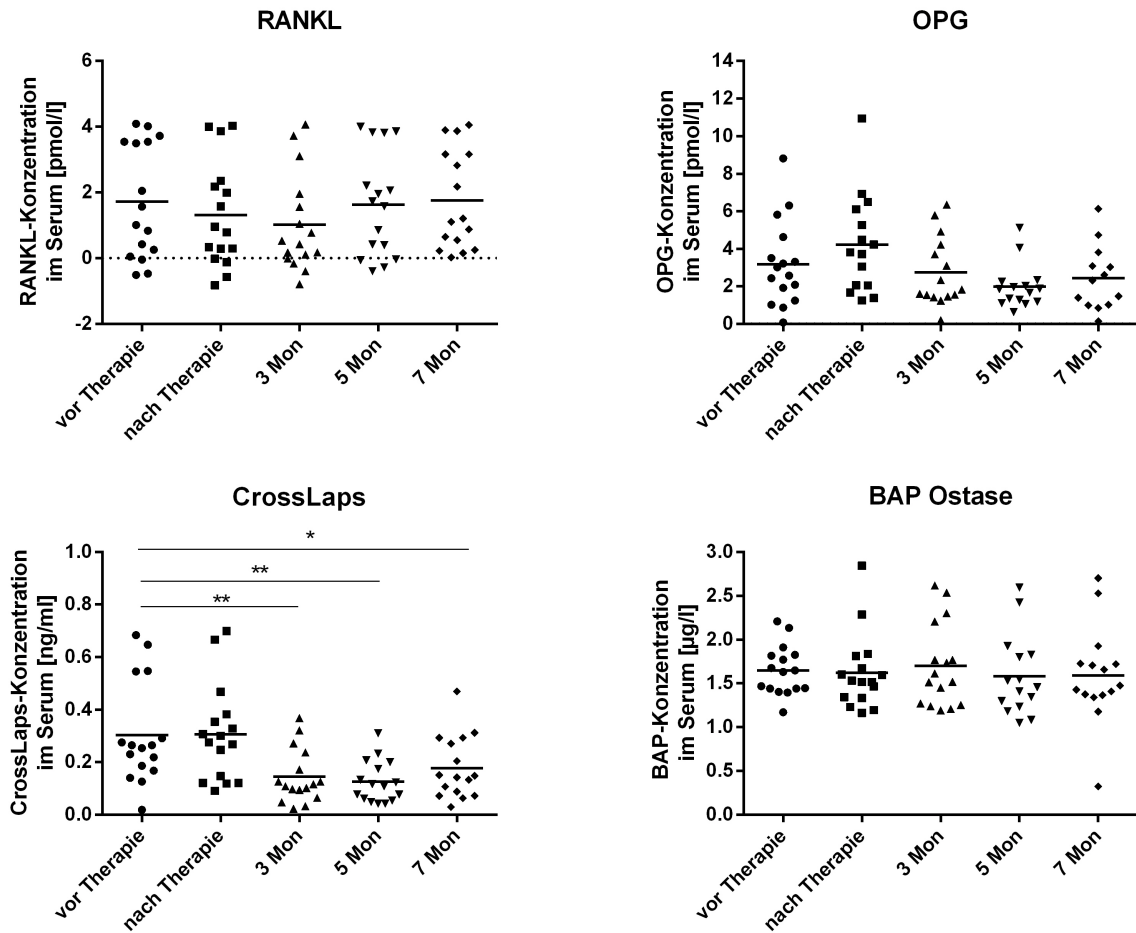


Abbildung 3.25: Analyse der Patientenseren vor und nach Therapie. Es wurden BAP, CrossLaps, RANKL und OPG mittels ELISA bestimmt. N=16-30. Mittelwert mit Linie gekennzeichnet. Statistik mit Wilcoxon Test ( $p < 0.05$ ), P-Werte: Crosslaps: vor vs. 3 Monate  $*p=0,0148$ ; vor vs. 5 Monate  $***p=0,0009$ ; vor vs. 7 Monate  $**p=0,0011$ .

# Kapitel 4

## Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Hypothese zur Wirkung von LD-RT untersucht. Dabei wurde angenommen, dass eine niedrige Dosis von Röntgenstrahlung oder von alpha-Teilchen (Radon) den Knochenmetabolismus während einer entzündlichen Knochenerkrankung normalisiert. Es wurde vermutet, dass die Balance der knochenabbauenden und knochenaufbauenden Zellen über eine strahleninduzierte Veränderung der Differenzierung und Proliferation wiederhergestellt wird sowie der Entzündungsvorgang durch eine Zunahme von immunsuppressiven Treg-Zellen gemindert wird.

### 4.1 Einfluss von Strahlung auf das Überleben und die Differenzierung von primären Osteoblasten

In Rahmen dieser Arbeit wurde die Auswirkung von ionisierender Strahlung auf die Proliferation und Differenzierung von Progenitoren in reife Osteoblasten untersucht. Aus publizierten Daten liegen vorwiegend Ergebnisse zu immortalisierten Zelllinien aus Mäusen oder Ratten vor, welche zu primären humanen Osteoblasten nur bedingt vergleichbar sind. Anhand der Ergebnisse der Phänotypisierung von isolierten MSCs (siehe Kap. 3.1.1) wurde von einer Mischpopulation aus Stammzellen sowie bereits weiter entwickelten Progenitoren ausgegangen. Die geringe Anzahl von isolierten MSCs aus Knochenmarksaspiraten ermöglichte keine sofortige Analyse der Zellpopulation, so dass erst nach einer längeren Proliferationsphase genügend Zellen zur Analyse herangezogen werden konnten. Dies wiederum führte zum veränderten Expressionsmuster der Oberflächenmarker, wie z.B. CD73. Neben Plastikadhärenz sowie Expression der Oberflächenmarker wurde die Multipotenz der isolierten MSCs nachgewiesen, indem sich die Zellen in Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten entwickelten (siehe Abb.3.2), was im Einklang mit Kriterien von ICST steht [154]. Somit wurden die isolierten Zellen aus Knochenmarkaspiraten als mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen betrachtet und für die Differenzierung in Osteoblasten genutzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Strahlensensitivität der primären humanen Osteoblasten hinsichtlich Proliferation, klonogenem Überleben und der Zellzyklusverteilung untersucht. Eine Bestrahlung mit 0.5 Gy Röntgenstrahlung veränderte die Proliferation der

Osteoblasten nur minimal, während die Proliferation für 2 Gy Röntgenstrahlung verzögert war (siehe Abb.3.3). Da eine verzögerte Proliferation mit der für DNA-Reparatur benötigten Zeit in Verbindung gebracht wird, kann vermutet werden, dass die in dieser Arbeit verwendeten Osteoblasten die durch Strahlung vermittelten DNA-Schäden im Niedrig-Dosis Bereich schnell reparieren können, wohingegen die Schäden durch 2 Gy zur Verlangsamung der Proliferation führten.

Da die Proliferation der Zellen mit dem Zellzyklus zusammenhängt, wurde die Zellzyklusverteilung nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung untersucht. Im Hinblick auf die Zellzyklusverteilung der Osteoblasten nach Bestrahlung wurde festgestellt, dass die Bestrahlung mit 0.5 Gy und 2 Gy Röntgenstrahlung in den ersten 24 Stunden keine direkte Auswirkung auf den Zellzyklus hat. Erst nach 48h wurde eine leichte Akkumulation der mit 2 Gy Röntgenstrahlung bestrahlten Zellen in G2/S-Phase beobachtet (siehe Abb.3.4(b)). Die Untersuchung weiterer Zeitpunkte zeigte, dass bestrahlte Zellen (0.5 und 2 Gy) weiterhin in G2/S-Phase akkumulieren (siehe Abb.3.4(d-c)). Im Vergleich hierzu haben Studien von Sakurai et al 2011 [183] in der embryonalen Mäusezelllinie C3H10T1/2 einen G2-Zellzyklusarrest 6h nach Einwirkung von 3 und 6 Gy Röntgenstrahlung gefunden, welcher nach 24h bereits aufgelöst wurde. Ebenfalls wurde in humanen fötalen Osteoblasten (hFOB) nach Bestrahlung mit 4 Gy Röntgenstrahlung eine verringerte Proliferation und eine zunehmende Seneszenz der Zellen, welches einer anhaltenden Inhibition des Zellzyklus entspricht, beobachtet [184].

Im Koloniebildungstest wurde ersichtlich, dass die Zellen mit zunehmender Dosis ihre Fähigkeit zur Koloniebildung verlieren. Man kann die eingesetzten Osteoblasten mit Fibroblasten aus früheren Untersuchungen vergleichen (siehe Abb.4.1), da beide Zelltypen von MSCs abstammen. Dabei wird ersichtlich, dass beide Zelltypen mesenchymalen Ursprungs vergleichbare Koloniebildungsfähigkeiten nach einer Bestrahlung mit Röntgenstrahlung aufweisen.

Die verminderte Proliferation und Koloniebildungsfähigkeit sowie G2/S-Phasen-Akkumulation könnte auf eine strahleninduzierte, beschleunigte terminale Differenzierung zurückzuführen sein. Unter einer terminalen Differenzierung wird die Ausdifferenzierung der Zellen zu ihrem endgültigen Phänotyp verstanden [185, 186]. So wurde nach Bestrahlung eine beschleunigte Differenzierung bereits in Erythroblasten, Epithelzellen sowie Fibroblasten beobachtet [141, 142, 187, 188]. Aufgrund des mesenchymalen Ursprungs von Osteoblasten, liegt die Vermutung nahe, dass es in Osteoblasten ebenfalls zu einer frühzeitigen terminalen Differenzierung kommen könnte.

Aus den Ergebnissen zum Proliferationsverhalten und der Hinweisen auf eine strahleninduzierte terminale Differenzierung, wurde der Differenzierungsprozess in Osteoblasten nach Strahlenwirkung näher untersucht. Bezüglich der Wirkung von Bestrahlung auf das Verhältnis von Knochenaufbau und -abbau ist bekannt, dass die Bestrahlung von Knochengewebe während einer Tumorthherapie mit einer Gesamtdosis von bis zu 40 Gy Röntgenstrahlung zu fragilen Knochenstrukturen führen kann [189]. Wird eine Strahlentherapie bei Kindern durchgeführt, kommt es zur Wachstumsverzögerung des betroffenen Knochens. Diese negativen Effekte von hohen Dosen von Röntgenstrahlen werden im Niedrig-Dosis Bereich nicht beobachtet. Klinisch wird im Niedrigdosis-Bereich die Entzündungshemmung ausgenutzt, was eine Wirkung auf das Immunsystem nahelegt. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind aber nicht bekannt. Da das Immunsystem funktionell und molekular mit dem Knochenmetabolismus in enger Wechselwir-

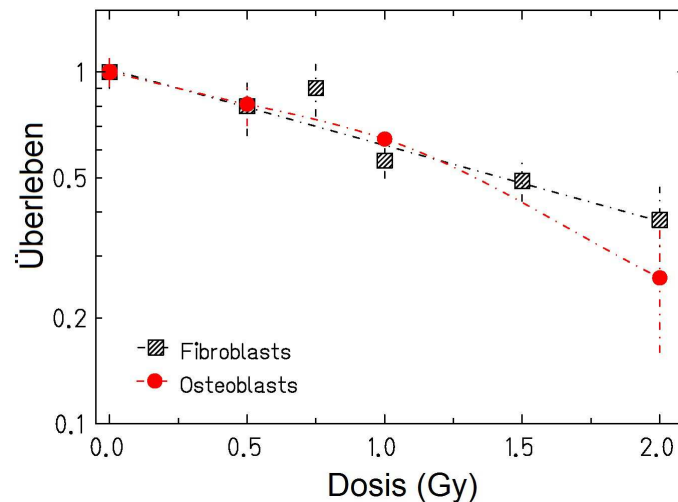


Abbildung 4.1: Relatives Überleben der Zellen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung. Vergleich der Strahlensensitivität von humanen primären Osteoblasten mit humanen Fibroblasten aus Vorhaut (AGD1522) (Daten zur Verfügung gestellt durch Kraft, D., GSI Darmstadt)

kung steht [190], ist es im Rahmen dieser Arbeit von Interesse zu verstehen, welche möglichen Auswirkungen eine Niedrig-Dosis Bestrahlung mit Photonen oder einer Radon-Therapie auf den Knochenmetabolismus hat, insbesondere auf die Differenzierung der Osteoblasten.

Osteoblasten unterliegen einem kontinuierlichen Differenzierungs-/Reifungsprozess. Während der Differenzierung von Osteoblasten aus MSCs werden bestimmte Gene aktiviert und andere herunterreguliert (siehe Abb.4.2). Die Genexpression von Osteoblastenmarkern ist abhängig vom Differenzierungsstatus der Zellen. Dabei entsteht eine dynamische und eng regulierte mRNA-Expression [191–194].

Die in dieser Arbeit untersuchte Expression von Differenzierungsmarkern (mRNA) zeigte für einige Marker eine Zunahme nach Niedrig-Dosis Bestrahlung, auch wenn die Abweichungen zwischen den einzelnen Spendern groß waren und es sich deshalb insgesamt nur um einen Trend handelte. Im Folgenden soll auf die einzelnen Differenzierungsmarker eingegangen werden.

Der in Osteoblasten festgestellte strahleninduzierter Trend zur Hochregulation von **Runx2** (core binding factor alpha 1) (siehe Abb.3.6) insbesondere für eine niedrige Dosis (0.5 Gy) Röntgenstrahlung nach 24 Stunden steht im Einklang mit bereits publizierten Daten. Hierbei wurde eine Zunahme der Runx2-Expression nach Bestrahlung in den primären Maus-Osteoblasten mit 1 und 2 Gy Röntgenstrahlung [195] oder in einer Osteoblasten-Zelllinie aus Mäusen (MC3T3-E) mit 0.5 und 1 Gy Röntgenstrahlung [196] festgestellt. Diese Ergebnisse sind insbesondere wichtig, da Runx2 eine entscheidende Rolle in der Regulation der Transkription knochenspezifischer Gene hat [197–200] und somit den Phänotyp der Pre-Osteoblasten hin zu reifen Osteoblasten verändert. Eine Hochregulierung der Runx2-Expression nach Bestrahlung mit einer hohen Dosis Röntgenbestrahlung (10 Gy) wurde auch in Myofibroblasten, einer Zwischenform zwischen glatten Muskelzellen und Fibroblasten in Wundbereichen, beobachtet

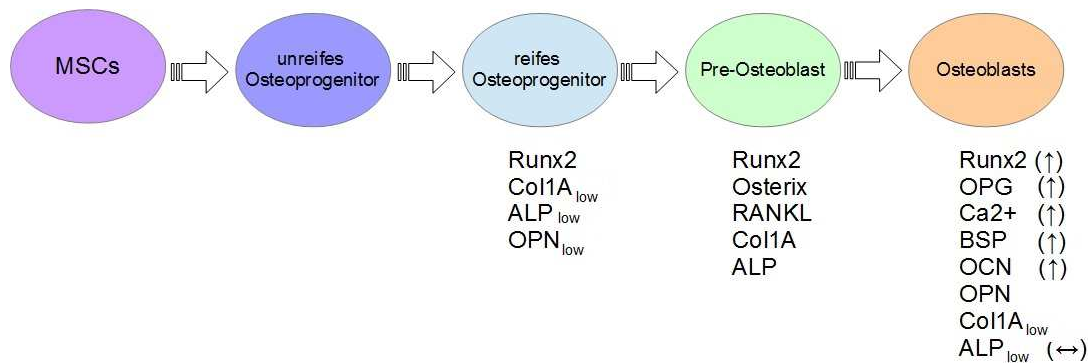


Abbildung 4.2: Differenzierungsprozess von MSCs zu Osteoblasten. MSCs durchlaufen einen Differenzierungsprozess, während bestimmte Transkriptionsfaktoren und Gene an- und ausgeschaltet werden. In reifen Osteoprogenitoren sind Faktoren wie ALP oder Col1A nur niedrig expremiert (low), während diese in reifen Osteoblasten zusammen mit Runx2 und BSP hochreguliert sind. In dieser Arbeit gewonnene Erkenntnisse in Osteoblasten sind mit Pfeilen dargestellt: Zunahme-(↑), Abnahme-(↓), keine Veränderung-(↔).

[201]. Diese Veränderung des Phänotyps wird in Zusammenhang mit einer fortschreitenden Verkalkung der Aortenklappe (kalzifizierten Aortenstenose) infolge einer Bestrahlung des Brustkorbs gebracht [202]. Diese Erkenntnisse zeigen, dass die Expression von Runx2 eine entscheidende Rolle in der Differenzierung und Funktionalität der Osteoblasten spielt.

Es gibt Grund zu der Annahme, dass die Expression von Runx2 und somit die Differenzierung von Osteoblasten während einer entzündlichen Erkrankung verändert vorliegt und somit die Expression von Runx2 ebenfalls verändert ist. So wurde gezeigt, dass die Differenzierung von Osteoblasten durch  $TNF\alpha$  inhibiert wird [203]. Demnach könnte das anti-entzündlich wirkende Zytokin  $TGF\beta$  zur Aktivierung der Differenzierung in Osteoblasten beitragen. In Serum mit Radon therapierten Patienten wurde eine erhöhte  $TGF\beta$ -Level festgestellt [97], so dass eine Zunahme der Runx2-Translokation via Smad-Signalweg [204, 205] vermutet werden kann. Als Konsequenz der Runx2-Translokation in den Kern folg die Aktivierung der Genexpression.

Neben Runx2 wurde der Transkriptionsfaktor **Osterix**, welcher für die Differenzierung und Knochenformation durch Osteoblasten erforderlich ist [13], untersucht. Allgemein ist bekannt, dass Osterix-defiziente Mäuse weder eine intramembrane noch endochondrale Knochenbildung zeigen und gleichzeitig die Differenzierung von Osteoblasten inhibiert ist. Die Studien zeigten auch, dass die Genexpression von Osterix der von Runx2 nachgeschaltet ist [13, 206, 207].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten eine zeitliche Verzögerung der strahleninduzierten Osterix-Expression im Vergleich zu Runx2 (siehe Abb.3.6). Während die Expression von Runx2 bereits 24 h nach Röntgenbestrahlung zunahm, wurde eine Hochregulierung von Osterix erst nach 5 Tagen gemessen. Die Ergebnisse werden durch Untersuchungen in einer Osteoblasten-Zelllinie (MC3T3-E1) unterstützt [208], welche eine Zunahme der Osterix-Expression erst 7 Tage nach Bestrahlung mit 0.5 Gy Röntgenstrahlung bei einer unveränderten Runx2-Expression zeigten. Anhand der Literatur und Ergebnissen in dieser Arbeit lässt sich somit sagen, dass Runx2 und Osterix in unterschiedlichen Differenzierungsphasen der Osteoblasten aktiv sind und sich zusätzlich durch Strahlung beeinflussen lassen. Die strahleninduzierte Beschleunigung der Differenzierung von Osteoblasten wird, entsprechend dem Trend zu einer strahleninduzierten



Expression der Transkriptionsfaktoren, anhand einer erhöhten intrazellulären Menge von Proteinen zeigen, welche für die Mineralisierung der Knochenmatrix verantwortlich sind. Die in dieser Arbeit untersuchten Proteine **Osteocalcin** (OCN) und **Bone Sialoprotein** (BSP) erlauben eine Beurteilung der Auswirkungen von Strahlung auf die Funktionalität der Osteoblasten.

**Osteocalcin** ist ein Marker für das Mineralisierungsstadium reifer Osteoblasten und bindet  $\text{Ca}^{2+}$  und Hydroxyapatit in der Matrix [209]. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigten zum ersten Mal in primären Osteoblasten eine erhöhte Osteocalcin mRNA Expression nach Bestrahlung (0.5 Gy und 10 Gy Röntgenstrahlung), jedoch nicht für 2 Gy Röntgenstrahlung. Dies war bislang nur für primäre Maus-Osteoblasten bekannt [195]. Da die Expression von Osteocalcin von Runx2 gesteuert wird [12], stehen die gewonnenen Ergebnisse im Einklang mit einer gestiegenen Runx2-Expression nach Bestrahlung.

Da die mRNA-Expression nur eine Vorstufe der endgültigen Proteintranslation ist, wurde in dieser Arbeit zusätzlich die Protein-Freisetzung von OCN untersucht. In Folge der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung wurde eine erhöhte OCN-Freisetzung über der gesamten Kultivierungsdauer gemessen (siehe Abb.3.9).

Obwohl ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Expression von Osterix und Osteocalcin in der murinen Osteoblasten-Zelllinie (MC3T3-E1) beschrieben wurde [210], wurde in Rahmen dieser Arbeit keine zeitliche Übereinstimmung in deren Expression im humanen System beobachtet. Jedoch ist MC3T3-E1 eine Maus-Zelllinie, welche unter Umständen eine andere zeitliche Abfolge der Expression nach Bestrahlung aufweist als die hier untersuchten humanen primären Osteoblasten.

Die Synthese von Osteocalcin hängt von der Runx2-Smad Interaktion im Kern ab. Aus einigen Publikationen ist bekannt, dass Runx2 mit  $\beta$ -Catenin in den Kern wandert, dort eine Interaktion mit Smad eingeht und somit den Promotor für OCN aktiviert [211, 212]. Nun wurde bereits im Rahmen dieser Arbeit eine im Trend erhöhte mRNA-Expression von OCN und Runx2 nach Bestrahlung gemessen, welche der Zunahme der OCN-Freisetzung vorausgehen oder für sie verantwortlich sein könnte. Ob Runx2 nach Bestrahlung von Smad sowie  $\beta$ -Catenin aktiviert wird, muss in weiteren Untersuchungen verfolgt werden. Ebenso bleibt vorerst offen ob Runx2 Translokation durch eine strahleninduzierte Phosphorylierung durch MAPK [213] oder Smad verstärkt abläuft. Die vorläufige Untersuchungen in Rahmen dieser Arbeit deuten auf eine strahleninduzierte (0.5 Gy) Zunahme von  $\beta$ -Catenin Signaltransduktion in Osteoblasten, was nochmal die Expression von OCN und Runx2 nach Bestrahlung begründen könnte.

Neben der Expression von OCN wurde die Expression von Bonesialoprotein (BSP) in dieser Arbeit untersucht. BSP ist ein mineralisierendes, nicht-kollagenes Protein. Seine Inkorporation in die extrazelluläre Knochenmatrix und Bildung des Hydroxyapatit-Kristals deutet auf seine bedeutende Rolle in der Mineralisierung des Knochens hin [214].

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigten eine erhöhte BSP-Expression infolge einer Bestrahlung mit 0.5 Gy Röntgenstrahlung im Vergleich zur Kontrolle, während eine Bestrahlung mit hohen Dosen (2 und 10 Gy Röntgenstrahlung) die Expression wesentlich weniger beeinflusste (siehe Abb.3.6). In einer Studie von Bouleftour et al 2014 [215] wurde die Abhängigkeit der Expression von BSP und Osteocalcin sowie Runx2 gezeigt. Demnach wurden in BSP-defizienten Mäusen infolge des Fehlens von BSP weniger OCN, Runx2 und Osterix



exprimiert. Daraus folgt, dass die in dieser Arbeit gemessene strahleninduzierte Zunahme der Runx2-, Osterix- sowie OCN-Expression mit der erhöhten Expression von BSP zusammenhängt. Es fehlt dennoch weiterhin die Aufklärung der molekularen Signalwege, welche die strahleninduzierte Überexpression dieser Proteine einleiten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine strahleninduzierte Zunahme von Runx2, Osterix, OCN und BSP zur einem gesteigerten Knochenaufbau und Mineralisierung *in vitro* führen kann und bei einer Übertragung der Ergebnisse auf die Situation *in vivo* könnte es die pathologische Knochenveränderungen in RA-Patienten lindern.

An der Mineralisierung der Knochenmatrix sind neben OCN und BSP auch alkalische Phosphatasen (ALP) beteiligt. Die durch Bestrahlung unveränderte ALP-Konzentration in Osteoblasten, welche im Rahmen dieser Arbeit gefunden wurde (siehe Abb.3.7), steht im Einklang mit den publizierten Daten. So beschreibt Qiu et al 2012 [216] eine gleichbleibende ALP-Expression nach 0.5 Gy Röntgenstrahlung in humanen Osteoblasten. Auch in primären Osteoblasten aus Ratten wurde nach Bestrahlung mit 0.4 Gy Röntgenstrahlung keine Änderung festgestellt [217]. Dennoch wurde in anderen Arbeiten bereits eine strahleninduzierte, dosisabhängige ALP Expression beobachtet, dies jedoch wiederum in den murinen Zelllinien C3H10T1/2 [183] oder in MC3T3-E1 [218]. Diese Unterschiede könnten zum einen darauf zurückzuführen sein, dass unterschiedliche Zellsysteme aus unterschiedlichen Spezies verwendet wurden und zum anderen dass das Differenzierungsstadium der bestrahlten Zellen unterschiedlich war. ALP wird besonders während der früheren Phasen der Mineralisierung vermehrt exprimiert, sodass unterschiedliche Zelllinien und ein unterschiedlicher Differenzierungsstatus der verwendeten Zellen zu abweichenden Ergebnissen führen können.

Neben dem Einfluss der alkalischen Phosphatase sind für die Mineralisierung der Knochenmatrix die Einlagerung von  $\text{Ca}^{2+}$  und anorganischem Phosphat durch Osteoblasten wichtig. Diese bilden dann den wichtigsten Bestandteil des Knochens, Hydroxyapatit. Aus diesem Grund können  $\text{Ca}^{2+}$ -Einlagerungen als Zeichen der Mineralisierung im Zusammenhang mit der fortschreitenden Differenzierung der Zellen stehen. Die Änderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einlagerungen nach der Bestrahlung mit niedrigen Dosen wurden bisher in humanen Zellen nicht untersucht und stellen eine weitere Möglichkeit dar, die Aktivität und das Differenzierungsvermögen von Osteoblasten zu beurteilen.

Die in dieser Arbeit gemessene strahleninduzierte Zunahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einlagerungen nach 0.5 Gy und 2 Gy Röntgenstrahlung (siehe Abb.3.8) werden durch publizierte Daten zu Maus-Zelllinien bestätigt. Es wird eine Zunahme der Mineralisierungsknoten in der murinen MC3T3-E1 Zelllinie nach einer Bestrahlung mit 0.5 Gy Röntgenstrahlung durch Xu et al 2012 [196] beschrieben. Eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme führt wiederum zur Zunahme der OCN-Expression [219], was mit den Ergebnissen dieser Arbeit übereinstimmt. Es besteht die Möglichkeit, dass die Ionenkanäle, welche für die Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  verantwortlich sind, durch die Bestrahlung direkt verändert werden oder eine vermehrte Expression des Kanalliganden zu dessen Aktivierung führt und letztendlich ein erhöhter Calcium-Einstrom in die Zelle stattfindet [220].

Nicht nur eine direkte Auswirkung von Bestrahlung auf die Differenzierung von Osteoblasten durch eine Hochregulierung der Transkriptionsfaktoren und matrixbildenden Proteine kann zu Veränderungen des Knochenmetabolismus führen, sondern auch die veränderte Expression

von den Osteoklastogenese-regulierenden Proteinen RANKL und OPG [221].

**RANKL** ist essentiell für die Differenzierung von Osteoklasten und somit für die Kontrolle des Knochenabbaus [222]. RANKL wird von Stromazellen im Knochenmark (Osteoblasten) [47, 164] sowie von Immunzellen wie Th17 oder dendritischen Zellen [23, 223] produziert; eine Induktion von RANKL wird für den Knochenabbau in RA verantwortlich gemacht [224].

Die Bestrahlung der Osteoblasten mit Niedrig-Dosis-Röntgenstrahlung veränderte nicht die Expression von RANKL, jedoch wurde in mit 10 Gy Röntgenstrahlung bestrahlten Osteoblasten eine Zunahme der RANKL-Expression beobachtet (siehe Abb.3.6). Dies steht im Einklang mit einer möglichen erhöhten Osteoklastogenese nach Tumorthherapie, indem mit hohen Dosen bestrahlte Osteoblasten vermehrt RANKL freisetzen und somit den Knochenabbau über Osteoklasten stimulieren [225]. Zusätzlich zeigte Bai et al 2005 [226], dass eine Induktion von RANKL unter anderem über ROS abläuft. ROS wird wiederum oft nach ionisierender Bestrahlung in den Zellen generiert [227].

Eine unveränderte RANKL-Expression lässt sich mit dem Differenzierungsstadium der Osteoblasten in Verbindung bringen. Die Expression von RANKL und OPG ändert sich im Laufe der Differenzierung, so steigt RANKL in früheren Differenzierungsphasen an, während OPG erst im Mineralisierungsstadium in reifen Osteoblasten vermehrt exprimiert wird [219]. Dabei ändert sich das Verhältnis von OPG/RANKL nur geringfügig.

In den Experimenten dieser Arbeit wurde keine Änderung der OPG-mRNA-Levels 24h nach Bestrahlung festgestellt. Es ist anzunehmen, dass die Osteoblasten zunächst Konfluenz erreichen müssen und die Mineralisierung der Matrix weit fortgeschritten sein muss, bevor der OPG-Level ansteigt (siehe Abb.3.9). Deshalb wurde die OPG-Freisetzung ins Kulturmedium nach Bestrahlung über einen Zeitraum von 14 Tagen bestimmt. Dabei wurde ein deutlicher Anstieg der OPG-Konzentration im Zellkulturüberstand nach 14 Tagen festgestellt. Sowohl in mit 0.5 Gy Röntgenstrahlung als auch in mit 2 Gy Röntgenstrahlung bestrahlten Zellen wurde eine Zunahme an OPG in Vergleich zur Kontrollen gemessen. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass bestrahlte Osteoblasten die Osteoklastogenese über eine OPG-Freisetzung inhibieren können. Eine nicht veränderte Expression von OPG nach 24 h zusammen mit einem deutlichen Anstieg der Freisetzung nach 14 Tagen zeigen noch einmal auf, dass der Zeitpunkt der Messung aufgrund der kontinuierlichen Differenzierung von Osteoblasten eine wichtige Rolle spielt.

Die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass eine Niedrig-Dosis Bestrahlung mit Röntgenstrahlung die Differenzierung von Osteoblasten beschleunigen und somit den Knochenaufbau fördern könnte. Die entsprechenden Hinweise zum Knochenaufbau nach 0.5 Gy Röntgenstrahlung *in vivo* wurden in Untersuchungen des Universitätsklinikums Erlangen erbracht. Sie zeigen eine Zunahme der Knochendichte in htnf-Mäusen, welche TNF $\alpha$  überexprimieren und arthritische Gelenke ausbilden (U.Gaipl, persönliche Kommunikation).

Für weitere Untersuchungen wäre eine fraktionierte Bestrahlung mit 0.5 Gy Röntgenstrahlung wie es in der LD-RT praktiziert wird, eine weitere Möglichkeit die Effekte in den Zellen zu untersuchen. Um den Vergleich zur Auswirkungen der Tumorthherapie zu ziehen, in der eine Fraktionierung mit 2 Gy Photonenstrahlung mit einer Gesamtdosis von bis zu 60 Gy appliziert wird, sollten ebenfalls Experimente durchgeführt werden, um einen gegenteiligen dosisabhängigen Effekt aufzuzeigen.

## 4.2 Differenzierung und Aktivität der Osteoklasten nach Bestrahlung

Der Knochenabbau stellt neben der chronischen Entzündung in RA ein großes Problem dar. Der Abbau des Knochens erfolgt durch Osteoklasten, welche mittels Enzymen wie Cathepsin K und dem pH-Gradient den Knochen aktiv resorbieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde angenommen, dass die LD-Röntgentherapie und die Radon-Therapie die Aktivität der Osteoklasten unterbindet, indem die Differenzierung der Zellen verlangsamt oder ganz ausgesetzt wird.

Die *in vitro* Untersuchungen in dieser Arbeit haben gezeigt, dass Niedrig-Dosis Röntgenstrahlung (0.5 Gy) keine Auswirkung auf die Apoptoserate der Vorläuferzellen und die Bildung von Osteoklasten hat (siehe Abb.3.10). Die Zellzahlen der gebildeten Osteoklasten verhielten sich in den Kontrollen wie auch in bestrahlten Zellen oszillierend, nahmen aber über die Beobachtungszeit nicht signifikant ab (siehe Abb.3.11). Die Beobachtung des oszillierenden Verhaltens der *in vitro* differenzierenden Osteoklasten wurde bereits von Akchutin et al 2008 [228] beschrieben. Dennoch wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt, dass eine Niedrig-Dosis-Bestrahlung der Osteoklasten-Vorläuferzellen *in vitro* keine Auswirkung auf die Reifung von Osteoklasten hat.

Die Aussagen in der Literatur bezüglich der Osteoklastenbildung nach Bestrahlung sind widersprüchlich. Sie reichen von einer Zunahme der Zellzahl [168, 229, 230] über keine Veränderung [225, 231, 232] bis hin zur Abnahme der Osteoklasten [233, 234]. So wurde in Scheven BA et al 1985 [234] gezeigt, dass die Osteoklasten-Zellzahl nach Bestrahlung mit 2,5 Gy Röntgenstrahlung in embryonalen Mausknöcheln abnimmt und die Knochenbildung zunimmt. Hingegen trat nach 10 und 20 Gy Röntgenstrahlung ein gegenteiliger Effekt von einer vermehrten Bildung der Osteoklasten und einer Minderung des Knochenwachstums auf. Weitere Studien zur Anwendung von hohen Dosen ionisierender Strahlung [168, 229, 230] zeigen, dass die Zellzahl der Osteoklasten zunimmt, was die Knochenatrophie nach Tumorthherapie begründen könnte. Die unterschiedlichen Ergebnisse, einschließlich der Daten der vorliegenden Arbeit, können mit hoher Wahrscheinlichkeit Unterschiede im Versuchsaufbau (Dosis, Strahlenqualität, Zeitpunkt der Analyse) zurückgeführt werden. Aber auch Unterschiede zwischen *in vitro* und *in vivo*, unterschiedliche Entwicklungsstadien der bestrahlten Zellen (embryonal versus adult) und der Spezies (Mensch versus Maus) können eine Rolle spielen (siehe Tab.4.1).

Da der Untersuchungszeitpunkt während der Reifung der Zellen eine wichtige Rolle spielt und sich dies in den publizierten Ergebnissen widerspiegelt, wurden weitere Experimente in dieser Arbeit auf den Endpunkt der Zellkultur fokussiert. So stellte sich heraus, dass die Bildung der Osteoklasten 14 Tage nach der Bestrahlung mit zunehmender Dosis abnimmt (siehe Abb.3.12). Wichtig ist jedoch festzuhalten, dass die Niedrig-Dosis-Bestrahlung mit 0.5 Gy Röntgenstrahlung keine Auswirkung auf die Differenzierung der Osteoklasten hatte.

Um die Frage zur Minderung der Osteoklastenbildung nach 2 und 10 Gy Röntgenstrahlung näher zu erörtern, wurde in dieser Arbeit die strahleninduzierte Apoptose von Osteoklasten-Vorläuferzellen näher untersucht. Es wurde festgestellt, dass die Bestrahlung Apoptose von nur wenigen Prozent in den Vorläuferzellen der Osteoklasten (Monozyten) auslöst (siehe Abb.3.10). Die vergleichsweise niedrige Apoptoserate in Monozyten steht im Einklang mit Bauer et al

2011 [146] und könnte in Sauerstoffmangel im verwendeten Buffycoat (Isolierungsquelle der Monozyten) begründet sein, da Bosco et al 2008 [235] und Fangradt et al 2012 [236] beschreiben, dass Hypoxie den HIF-1 und NF- $\kappa$ B Signalweg induziert. Die beiden Faktoren könnten die Zellen strahlenresistenter machen und ihr Überleben sichern. Dieses experimentelle Defizit könnte aber in dem vorliegenden Fall die physiologischen Bedingungen recht gut widerspiegeln, da auch im Blut sowie im Knochen unter entzündlichen Bedingungen hypoxische Bedingungen vorliegen. Während bei gesunden Patienten der Sauerstoffgehalt bei 6,6% liegt [237], ist dieser in entzündeten Bereichen deutlich geringer [238]. So zeigten Nomura et al 2014 [239] ein gesteigertes Wachstum von Osteoklasten unter hypoxischen Bedingungen (3, 5 und 10% O<sub>2</sub>) und einer Behandlung mit TNF $\alpha$ . Allerdings konnte keine Osteoklasten-Reifung unter gewöhnlichen Zellkulturbedingungen (20% O<sub>2</sub>) beobachtet werden. Diese Studien zeigen auf, dass die Auswahl der Zellkulturbedingungen sorgfältig gewählt und bei der Interpretation der Ergebnisse mit berücksichtigt werden müssen.

Zusammenfassend kann die geringere Osteoklastenreifung nach Bestrahlung mit einer hohen Dosis nicht auf strahleninduzierte Apoptose zurückgeführt werden.

Da das Absterben der Monozyten in diesem Versuchsmodell ausgeschlossen werden konnte, wurde die Expression der Proteine c-Src, TRAF6 und Cathepsin K nach einer Bestrahlung untersucht. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Niedrig-Dosis-Bestrahlung keine Auswirkung auf die intrazelluläre Proteinmenge hat (siehe Abb.3.16). Hohe Dosen von 10 Gy Röntgenstrahlung regulierten jedoch die Proteinmenge herunter. Der Vergleich von Proteinexpression in Vorläuferzellen sowie reifen Osteoklasten nach Bestrahlung (14 bzw. 19 Tage) ergab ein gleiches Expressionsmuster. Demnach gibt es keinen Unterschied in der Expression der oben genannten Marker in Abhängigkeit vom gewählten Bestrahlungszeitpunkt. Die Ergebnisse korrelieren mit den ermittelten Osteoklasten-Zellzahlen.

Die Differenzierung von Osteoklasten hängt nicht nur von dem hier untersuchten TRAF6 ab, sondern auch von dessen Interaktion mit RANK-Rezeptoren sowie der nachfolgenden Aktivierung von NF- $\kappa$ B und AP-1 Transkriptionsfaktoren [240]. Sun et al 2012 [241] beschreibt

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Literatur über strahleninduzierte Osteoklastenbildung

Publikation	Versuchsmodell	Strahlenart und Dosis	OC-Veränderung am Zeitpunkt
Willey et al 2008 [168]	in vivo mouse	7 Gy gamma	↑ 3d-7d
Kondo et al 2009 [229]	in vivo mouse	1-2 gamma	↑ 3d-10d
Yumoto et al 2010 [230]	in vivo mouse	50 cGy Fe-ion	↑ 3d
Sawajiri et al 2003 [233]	in vivo mouse	15-30 Gy C-ion/gamma	↑ 0-5d, ↓ 1-36w
Goblirsch et al 2005 [231]	in vivo mouse	20 Gy gamma	↓
Scheven et al 1985 [234]	ex vivo mouse	2,5 Gy X-ray	↓ 16d
Vit et al., 2006 [232]	in vivo mouse	6 Gy gamma	↔ 7d
Zunahme (↑), Abnahme (↓), keine Veränderung (↔), gamma: $\gamma$ -Strahlung, Fe-ion: Eisenionen, C-ion: Kohlenstoffionen			

eine Abnahme der RANK-Expression in einer murinen Osteoklasten-Zelllinie (RAW264.7). nach Bestrahlung mit 2 Gy  $\gamma$ -Strahlung. Inwiefern die Expression von RANK-Rezeptoren sowie die Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalweges durch Bestrahlung beeinflusst wird, erfordert weitere Experimente.

In Patienten mit RA weisen deren Knochen deutliche strukturelle Schäden auf, welche auf die Aktivität von Osteoklasten zurückzuführen sind. Um die Aktivität der Osteoklasten zu bestimmen wird TRAP sowie die Freisetzung abgebauter Kollagenfragmente (CTX) zur Analyse herangezogen. Die Phosphatase TRAP spaltet Phosphat-Gruppen z.B von OPN (Osteopontin) ab [242] oder unterstützt den Abbau von Kollagen [243]. Erhöhte TRAP-Werte wurden unter anderem in der synovialen Flüssigkeit von RA-Patienten gemessen [244].

In den Experimenten dieser Arbeit hatte die Bestrahlung keinen eindeutigen Effekt auf die TRAP-Aktivität der Osteoklasten, lediglich ein leichter Trend zur Zunahme wie in der Proteinexpression als auch in der freigesetzten Menge war in bestrahlten Vorläuferzellen detektierbar (siehe Abb.3.17). Die Ergebnisse deuten auf eine Abhängigkeit der Expression vom Zeitpunkt der Bestrahlung hin: während in bestrahlten Vorläuferzellen TRAP dosisabhängig steigt, wurde in den reifen Osteoklasten eine Abnahme nach Bestrahlung beobachtet. Die strahleninduzierte Zunahme der TRAP-Expression in bestrahlten Vorläuferzellen steht nicht im Widerspruch zu der gleichzeitig abnehmenden Osteoklasten-Zellzahl, da die noch nicht terminal zu Osteoklasten ausdifferenzierte Monozyten ebenfalls TRAP exprimieren. Da die TRAP-Expression im Western-Blot aus dieser Mischpopulation aus ausdifferenzierten Osteoklasten und Monozyten bestimmt wird, tragen beide Subpopulationen zum Anstieg der TRAP-Expression bei. Hingegen deutet die Reaktion von überwiegend ausdifferenzierten Osteoklasten auf die Bestrahlung noch einmal die Wichtigkeit der gewählten Zeiträume hin. Die Diskrepanz in den *in vitro* Untersuchungen der vorliegenden Arbeit könnte dadurch zu erklären sein, dass eine gewisse Spender-Variabilität besteht und die Kultivierung der Zellen auf Plastik erfolge. Die Aktivität der Osteoklasten kann erst auf einem physiologischen Substrat, also Knochenstücke oder andere mineralhaltige Oberfläche, beurteilt werden. Da es in Rahmen dieser Arbeit nur ein beschränkter Zugang zur Knochenstücken gab, wurden die überwiegenden Experimente auf Plastik-Oberfläche durchgeführt. Die wenigen vorliegenden publizierten Daten erleichtern die Interpretation der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse nicht wesentlich.

Auf den Knochenstücken bestrahlte Osteoklasten resorbierten signifikant weniger Knochenoberfläche im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abb.3.13), obwohl die Freisetzung von Kollagenfragmenten (CTX) der bestrahlten Proben 21 Tage nach Bestrahlung unverändert blieb. An diesem Punkt ist es anzumerken, dass Freisetzung von CTX nur eine Momentaufnahme von OC-Aktivität darstellt, weil alle drei Tage ein Mediumwechsel durchgeführt wurde und Zellen im Laufe der Kultivierungszeit ihre Aktivität verändern könnten. Somit wäre es wünschenswert, CTX-Werte über den gesamten Kultivierungszeitraum zu messen, um Schwankungen in der Aktivität der Osteoklasten nach Bestrahlung zu beurteilen.

Zusammenfassend wurden im Rahmen dieser Arbeit eine inhibierende Wirkung einer Hoch-Dosis Bestrahlung auf die Osteoklasten-Aktivität festgestellt, die sich in verminderter Expression der Transkriptionsfaktoren sowie reduzierten Refung der Osteoklasten zeigte. Zudem wurde eine deutlich geringere Fläche von bestrahlten Osteoklasten resorbiert. Eine Niedrig-Dosis



Bestrahlung hatte keine Auswirkung auf die Ausdifferenzierung sowie Protein-Expression der Osteoklasten; mit Ausnahme der überaus deutlichen Abnahme der resorbierten Fläche auf Knochenplättchen, die durch Zunahme der Knochendichte in htnf-Mausmodell nach fraktionierten Röntgenbestrahlung mit 0.5 Gy bestätigt wird (persönliche Kommunikation Gaipf, U., Universitätsklinikum Erlangen).

### 4.3 Strahleninduzierte Differenzierung von Tregs und Th17 Immunzellen

Die rheumatoide Arthritis zeichnet sich nicht nur durch eine schmerzende Veränderung der Knochenstruktur aus, sondern auch durch ein massives Einwandern der entzündlichen Immunzellen in den Gelenkspalt [245]. Die entzündlichen Immunzellen wie B-Zellen und T-Zellen setzen vermehrt Zytokine frei, welche die Entzündung und zusätzlich die Proliferation von knochenabbauenden Zellen unterstützen. Zu solchen Zytokinen zählen IL-1 $\beta$ , IL-17, IL-18, IFN $\gamma$  [246–248] sowie RANKL [249]. Die anti-entzündlichen Treg Zellen in RA-Patienten wurden als weniger suppressiv beschrieben und besitzen die Fähigkeit zu einer Transdifferenzierung in IL-17<sup>+</sup> Zellen [250]. Die Linderung der entzündlichen Symptome bei Radon-Patienten nach Exposition mit niedrig dosierter Strahlung führte im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Annahme, dass die Bestrahlung einen Anstieg von Treg Zellen oder eine Konversion von Th17 in Treg Zellen bewirken kann.

In Rahmen dieser Arbeit wurde die Differenzierung der Treg- und Th17-Zellen aus CD4<sup>+</sup> Zellen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung *in vitro* untersucht. Dabei wurden die CD4<sup>+</sup> Vorläuferzellen nach Bestrahlung in Anwesenheit verschiedener Zytokine, die für die Differenzierung in die Subtypen nötig sind und solchen, die im Serum von Radon-behandelten Patienten nachgewiesen wurden, differenziert [97, 251].

Die Kultivierung unter Bedingungen, die eine Th17 Differenzierung fördern (IL-1 $\beta$ , IL-23) ergab, dass nur die Bestrahlung mit hohen Dosen (10 Gy Röntgenstrahlung) eine Zunahme von Treg Zellen bewirkte und keinerlei Auswirkungen auf die Differenzierung der Th17 Zellen hatte (siehe Abb.3.19 (a)). Entgegen den Erwartungen hatte eine Niedrig-Dosis-Bestrahlung mit 0.5 Gy Röntgenstrahlung keinen Einfluss auf das Verhältnis Treg/Th17.

Erst durch die Zugabe von TNF $\alpha$  zur Simulierung der *in vivo* Situation im Gelenk eines RA-Patienten [252], oder TGF $\beta$  zur Simulierung der Änderungen nach Radontherapie [97], zeigte der Anteil von Treg Zellen einen Trend zur Zunahme während der Th17-Anteil unverändert blieb (siehe Abb.3.19 (b-d)). Die Bestrahlung induzierte unter diesen Bedingungen bei einer hohen Dosis Röntgenstrahlung (10 Gy) ein reziprokes Verhältnis aus: eine Zunahme der Treg Zellen und eine Abnahme von Th17-Zellen. Dieses Verhältnis wurde auch in der Freisetzung von IL-10 durch Treg Zellen sowie IL-17A durch Th17 Zellen sichtbar mit Zunahme der Dosis nimmt das Verhältnis von IL-10/IL-17 zu. Erstaunlich ist jedoch, dass IL-10 keine deutliche Zunahme anzeigte, während IL-17 abnahm. Es deutet darauf hin, dass Treg Zellen sich vermehrt ausbilden, aber die IL-10 Freisetzung und damit deren Funktionalität unverändert bleibt. Eine andere Erklärung wäre, dass die in der Zellkultur freigesetzte IL-10-Menge durch andere Zellen wie Th1 oder Th2 bereits zum Messzeitpunkt gebunden ist und man somit

keine eindeutige Aussage treffen kann.

Um die generelle Strahlensensitivität der angereicherten  $CD4^+$ -Zellen nach Röntgenstrahlung unter den gegebenen Bedingungen zu beurteilen, wurden Zellzahlen am Ende der Differenzierungsphase bestimmt (siehe Abb.3.18). Die  $CD4^+$ -Zellen proliferierten nach einer 10 Gy Röntgenbestrahlung weniger als die mit 0.5 Gy Röntgenstrahlung bestrahlten oder unbehandelten Zellen. Das könnte bedeuten, dass die  $CD4^+CD25^+$ -Zellen, welche potentiell zu Tregs differenzieren können, die Bestrahlung besser überlebten und deshalb ihr Anteil gegenüber den Th17-Zellen anstieg. Eine geringere Strahlensensitivität von Treg Zellen wurde berichtet und mit einer erhöhten Bcl-2-Expression in  $CD4^+CD25^+$ -Zellen im Vergleich zur  $CD4^+CD25^-$ -Zellen in Zusammenhang gebracht [253, 254]. Die Veränderungen des Verhältnisses von Treg Zellen zu anderen T-Zellen nach Bestrahlung mit 0.5-2 Gy Photonenstrahlung wurden in Tiermodellen bereits gezeigt [147, 253, 255, 256]. Dies könnte an der erhöhten Proliferation der  $CD4^+CD25^+$ -Zellen im Vergleich zu  $CD4^+CD25^-$  liegen [257].

Ein anderer Aspekt ist, dass nach der Bestrahlung auch die Umgebung der Zellen verändert wird, so dass nicht zwingend eine direkte Wirkung der Strahlung die Zunahme der Tregs erklärt. So wurde gezeigt, dass  $TGF\beta$  nach der Bestrahlung aktiviert und freigesetzt wird [258] und dann als einer der wichtigen Faktoren die Differenzierung von Tregs positiv beeinflussen kann [259]. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit deutlich veranschaulicht, indem die Bestrahlungsversuche mit und ohne  $TGF\beta$  durchgeführt worden sind. Bei Zugabe von  $TGF\beta$  hatten auch niedrige Dosen (0.5 Gy Röntgenstrahlung) zu einem signifikanten Anstieg der Tregs geführt, wie auch durch Kachikwu et al 2011 [260] in einem Tiermodell gezeigt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Bestrahlung im Niedrig-Dosis-Bereich das Verhältnis von entzündlichen und anti-entzündlichen Zellen regulieren kann und somit eine mögliche Erklärung zur Wirkung einer Radon-Therapie bei entzündlichen Erkrankungen sein kann.

Um die *in vitro* Ergebnisse zu unterstützen wurde im Rahmen einer Patientenstudie zur Wirkung der Radon-Therapie bei entzündlichen muskuloskeletalen Erkrankungen der Treg/Th17-Anteil im peripheren Blut der Patienten vor und nach der Therapie bestimmt.

Der Anteil der entzündlichen Th17-Zellen im Blut wurde zu fünf Zeitpunkten überprüft: vor, direkt im Anschluss der Therapie sowie drei, fünf und sieben Monate nach der Therapie. Die festgestellten Anteile der Th17-Zellen änderten sich bis 5 Monate nach Therapie nicht und waren vergleichbar mit denen von gesunden Spendern. Nach sieben Monaten wurde eine Abnahme der Th17-Zellen beobachtet. Diese Abnahme kann nicht aufgrund einer Einnahme von Medikamenten erfolgt sein, denn laut ärztlichen Fragebogen hat keiner der Patienten schmerzlindernde o.ä. Medikamente zu diesem Zeitpunkt eingenommen. Somit kann ein technischer Messfehler nicht ganz ausgeschlossen werden, wie beispielsweise ein nicht funktionierender Antikörper.

Die vergleichbaren Anteile von Th17-Zellen in Patientenproben vor der Therapie und in gesunden Spendern weisen entweder auf eine nicht Th17 abhängige Erkrankung hin oder die Veränderung des Th17-Anteils findet nur lokal und nicht systemisch statt. Deshalb würde man keine signifikante Änderung im peripheren Blut detektieren können. Eine Messung der Synovialflüssigkeit aus den betroffenen Gelenken würde einen besseren Einblick gewähren.

Die Ansicht, dass IL-17 und somit Th17-Zellen eine wichtige Rolle in arthritischen Autoimmunerkrankungen spielen, hat sich mittlerweile manifestiert. Hueber et al 2010 [261] zeigten

anhand einer Patientenstudie, in der den Patienten ein IL-17-Antikörper verabreicht wurde, deutliche Besserungen des Krankheitsverlaufes. Im Gegensatz dazu stellte Leipe et al 2010 [262] keinen Unterschied der IL-17-Konzentrationen im Serum der RA-Erkrankten und Gesunden fest, wobei der Th17-Anteil in RA-Patienten erhöht war. Dies wurde auch von Appel et al. 2011 [263] gezeigt, die ebenfalls keinen Unterschied im Anteil der Th17-Zellen im Blut von Gesunden und Erkrankten gefunden haben. Die Messungen von IL-17 und IL-15 in RA-Patienten zeigen jedoch signifikant höhere Konzentration sowohl im Blut als auch in der Synovialflüssigkeit [264]. Demnach stellt sich die Frage, ob Th17-Zellen als einzige Quelle für die Freisetzung von IL-17 betrachtet werden sollen, denn andere Zellen wie Granulozyten, Mastzellen oder Monozytenvorläufer [263, 265] können ebenfalls IL-17<sup>+</sup> freisetzen. Aus diesem Grund wäre es interessant, sich direkt in Biopsien die Anteile anderer IL17<sup>+</sup> freisetzenden Zellen anzuschauen.

Die Messungen zur Bestimmung des Treg-Anteils in Patienten nach Radontherapie haben eine Steigerung des Treg-Anteils direkt nach der Therapie sowie in den darauf folgenden Monaten zur Folge. Die schwierige praktische Gestaltung der Experimente in dieser Arbeit erlaubten nur Messungen an drei Patienten vor und nach der Therapie, so dass eine adäquate Einschätzung der Ergebnisse im Vergleich zu gesunden Probanden schwierig ist. Trotzdem ist anzunehmen, dass die Treg-Zellpopulation von RA-Patienten vor der Therapie nicht höher sein sollte als in gesunden Probanden [266, 267]. Ein Vergleich mit gesunden Probanden zeigte eine hochsignifikante Zunahme ( $p < 0,001$ ) an Treg in Patienten nach 7 Monaten Therapie (siehe Abb. 3.24). Die Zunahme könnte mit der gestiegenen TGF $\beta$ -Konzentration [97] nach einer Radon-Therapie zusammenhängen bzw. bei einem Rückgang der TNF $\alpha$ -Konzentration im Serum von Patienten, würden die inaktiven Treg-Zellen ihre suppressiven Eigenschaften wiedererlangen. So wurde bereits gezeigt, dass Treg-Zellen von RA-Patienten vermehrt TNF-Rezeptor II (TNFRII) exprimieren und durch TNF $\alpha$  die Expression von Foxp3 abnimmt [268]. Bisherige Studien zur Treg-Regulierung in RA zeigen, dass eine Zunahme von Treg einen positiven Krankheitsverlauf mit sich bringt [269].

#### 4.4 Messungen der für den Knochenmetabolismus relevanten Zytokine im Patientenserum

Die Durchführung der Analyse von Patientenseren erfolgte erst nach *in vitro* Untersuchungen mit Röntgenbestrahlung, da die zeitliche Gestaltung der RADON-Studie erst in zweiten Hälfte der vorliegenden Promotionsarbeit dies ermöglichte. Dadurch wurde zunächst in *in vitro* Untersuchungen erste Ergebnisse mit Röntgenbestrahlung gewonnen, welche zum mechanistischen Verständnis der LD-RT beitragen sollten. Eine Studie zur Photonen-Therapie ist für 2015 geplant, die weitere Erkenntnisse und Vergleiche zur Radon-Therapie erbringen wird.

Um die Linderung der Symptome von Patienten nach Radon-Therapie besser zu verstehen, wurden für den Knochenmetabolismus relevante Zytokine im Serum der Patienten parallel zur Bestimmung der Immunzellen untersucht.

Für die Osteoklastogenese wichtige Faktoren wie RANKL und der OPG, welche jeweils Osteoklasten aktivieren oder inhibieren, wurden im Rahmen dieser Studie bestimmt. Trotz



der Erwartungen und bereits publizierten Daten zum Anstieg des OPG/RANKL Verhältnisses nach Radon-Therapie [97], konnte keine signifikante Änderung, weder der RANKL- noch OPG-Konzentration im Serum der Patienten nach der Therapie festgestellt werden (siehe Abb.3.25). Zum einen kann es an der unterschiedlich verwendeten Strahlenqualitäten ( $\alpha$ -Partikel vs. Photonen) oder an den Patienten-Kohorten liegen, da Moder et al [97] ausschließlich Patienten mit ankylosierenden Spondylitis untersuchten. In der RADON-Studie wurden Patienten mit muskuloskelettalen Erkrankungen aufgenommen, jedoch keiner litt an einer systemischen chronisch-entzündlichen Erkrankung wie RA, somit wären die Veränderungen im OPG/RANKL Verhältnis weniger wahrscheinlich.

RANKL und OPG werden jedoch nur selten zur klinischen Diagnostik von RA verwendet. So könnten RANKL sowie OPG lokal am Gelenk deutlich konzentrierter vorliegen als im peripheren Blut, so dass die Änderung im Blut nicht detektierbar wäre. So wurde z.B. in RA Patienten nach einer anti-TNF Therapie zwar ein Rückgang des Knochenabbaus beobachtet, jedoch keine Änderung von RANKL/OPG Verhältnisses im Serum [270]. Dies könnte an der  $\text{TNF}\alpha$ -abhängigen Osteoklasten-Differenzierung liegen, so können weniger OCs in der Abwesenheit von  $\text{TNF}\alpha$  differenzieren und aktiv werden. Zudem wird RANKL auch von anderen Zellen in verschiedenen Geweben produziert, so dass kein eindeutiger Rückschluss auf eine mögliche Änderung der im Knochenmetabolismus beteiligten RANKL-Produzenten möglich ist.

Zur weiteren Untersuchung der möglichen Änderungen in der Aktivitäten der Osteoklasten wurden Kollagenfragmente (CTX) im Serum der Patienten gemessen. Osteoklasten setzen aufgrund des Knochenabbaus Kollagenfragmente frei, welche anschließend im Blut detektierbar sind. Die CTX-Werte nahmen drei Monaten nach der Therapie ab und blieben nach fünf und sieben Monaten ebenfalls niedriger als vor der Therapie. Dies deutet auf eine verringerte Aktivität von Osteoklasten durch die Radon-Therapie hin. Zudem gibt es weitere Hinweise auf eine Treg-gesteuerte Inhibierung der Osteoklastogenese *in vitro* sowie *in vivo*, welche in Mäusen mit Kollagen-induzierten Arthritis mittels induzierten Treg Zellen eine Besserung der Erkrankung erzielen oder *in vitro* in humanen Treg Zellen die Inhibition von Osteoklasten zeigen [271–274]. So könnte die im Rahmen der vorliegenden Arbeit detektierte Zunahme der Treg-Zellen im Blut von Patienten bedeuten, dass Osteoklasten durch ein vermehrtes Freisetzen von IL-10 und  $\text{TGF}\beta$  durch Treg-Zellen inhibiert werden. Dafür sollten IL-10- und  $\text{TGF}\beta$ -Freisetzung der Treg-Zellen von Radon-Patienten *ex vivo* untersucht werden.

Ein weiterer, ebenfalls in der Diagnostik eingesetzter Marker ist die knochenspezifische Alkalische Phosphatase (BAP), welche von Osteoblasten freigesetzt wird und dem Knochenaufbau dient. Mittels der BAP-Konzentrationsbestimmung im Serum kann auf die Osteoblastenaktivität zurückgeschlossen werden. Die BAP-Konzentration im Serum der Patienten blieb nach der Radon-Therapie unverändert. Also wurden die Osteoblasten durch die Niedrig-Dosis-Bestrahlung nicht zur Freisetzung der Alkalinen Phosphatase angeregt. Dies hatte sich im Rahmen dieser Arbeit auch für *in vitro* mit Röntgenstrahlung bestrahlte Osteoblasten gezeigt, da die ALP-Konzentration nach einer 0.5 Gy Röntgenstrahlung Bestrahlung nicht angestiegen ist.

## Kapitel 5

### Fazit

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Niedrig-Dosis Bestrahlung eine Auswirkung auf den Knochenmetabolismus und somit einen möglichen Einfluss auf Entzündungsvorgänge durch den Knochenabbau bei rheumatoider Arthritis (RA) hat. Die gewonnenen Erkenntnisse ergänzen somit das Wissen über molekulare und zelluläre Wirkungsmechanismen von Niedrig-Dosis (LD-RT) und Radon- Therapie. Während *in vitro* Untersuchungen mit Röntgenstrahlung von 0.5 Gy als Einzeldosis appliziert wurden, wurde im Rahmen einer Radon-Therapie ein Bruchteil dieser Dosis verabreicht.

Es konnte gezeigt werden, dass niedrig bis moderat dosierte Röntgenstrahlung (0.5-2 Gy) eine beschleunigte Differenzierung von knochenbildenden Osteoblasten zufolge hatte und somit die Freisetzung von Faktoren entscheidend beeinflusst. In diesem Zusammenhang wurde eine gleichbleibende Freisetzung von RANKL (fördert Aktivität von Osteoklasten), aber vor allem eine deutlich erhöhte Freisetzung von OPG (inhibiert Osteoklasten) gemessen. Die gewonnenen Ergebnisse aus den *in vitro* Experimenten deuten auf einen vorübergehenden Prozess des Knochenaufbaus infolge der Bestrahlung hin. Entsprechende Beobachtungen wurden auch in einem polyarthritischen Mausmodell nach LD-RT innerhalb des Forschungsverbundes GREWIS gemacht (persönliche Kommunikation Gaipf, U., Universitätsklinikum Erlangen). Dadurch könnte bei RA-Patienten durch eine LD-RT, die Knochenstruktur wieder gestärkt und die Osteoklastogenese mechanistisch über die RANKL/OPG-Achse inhibiert werden. Die Vermutung, dass die LD-Bestrahlung eine reduzierte Osteoklastendifferenzierung zur Folge hat, konnte nicht bestätigt werden. Bestrahlte Vorläuferzellen zeigten einen normalen Differenzierungsverlauf. Entsprechend der ursprünglichen Erwartung wurde eine Abnahme der resorbierenden Aktivität von Knochen (physiologisches Substrat) nach einer Bestrahlung im Dosisbereich von 0.5 bis 10 Gy gemessen. Hervorzuheben ist, dass die für niedrige Dose erwarteten inhibierenden Effekte auf Osteoklasten auch bei hohen Dosen beobachtet wurden, während bei Patienten, die mit hohen Dosen bestrahlt wurden (Tumorthherapie) eher Knochenabbau beobachtet wird. Ob es sich *in vivo* um andere Prozesse handelt, die bei hohen Dosen induziert werden und damit das Gesamtbild verändern, bleibt zu klären. Mithin konnte eine Abnahme der resorbierenden Aktivität von Osteoklasten auch in polyarthritischen Mäusen nach Mehrfachstrahlung mit einer niedrigen Dosis Röntgenstrahlung beobachtet

werden. Eine direkte Folge der Bestrahlung ist die reduzierte Osteoklastenaktivität, welche sich auch *in vivo* im Serum von Radon-behandelten Patienten, durch eine deutliche Abnahme der Kollagenfragmente nach Therapie zeigte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass bei Radon-behandelten Patienten eine Verschiebung des Verhältnisses zwischen entzündungs-stimulierenden und - hemmenden Lymphozyten (Th17/Treg) nach Therapie kommt. Diese Änderung im Reifungsmuster könnte durch Freisetzung spezifischer Faktoren, ebenfalls zu einer Inhibition der Osteoklasten-Aktivität beitragen. Die Verschiebung der Verhältnisse zwischen TH17 und Treg konnte in *in vitro* Untersuchungen mit Röntgenstrahlung, insbesondere in Gegenwart von  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{TGF}\beta$ , die im Serum von Patienten ebenfalls erhöht vorlagen, beobachtet werden.

Wie in Abb.5.1 schematisch dargestellt, ergibt sich folgende Hypothese zum Einfluss von Röntgenbestrahlung (LD-RT) auf den Knochenmetabolismus und damit auf chronische Entzündungsvorgänge:

1. Bestrahlung beschleunigt die Differenzierung von Osteoblasten und führt zur Freisetzung von Faktoren, die die Aktivierung von Osteoklasten hemmen
2. Bestrahlung verschiebt das Verhältnis Th17/Treg während der Reifung zu Gunsten der entzündungshemmenden Treg, welche die Aktivität von Osteoklasten hemmen können
3. Bestrahlung inhibiert die Differenzierung von Osteoklasten nicht direkt, allerdings wird die Aktivität inhibiert

Für *in vivo* Untersuchungen der Patientenproben nach Radontherapie gelten ebenfalls gleiche Aspekte wie unter 2. und 3. Weitere *in vitro* Versuche mit fraktionierter Niedrig-Dosis Röntgenbestrahlung ähnlich wie in LD-RT bzw. Radontherapie sollen die gewonnene Erkenntnisse unterstützen. Weiterhin sollte gezeigt werden, ob nach  $\alpha$ -Bestrahlung vergleichbare zelluläre Prozesse ablaufen.

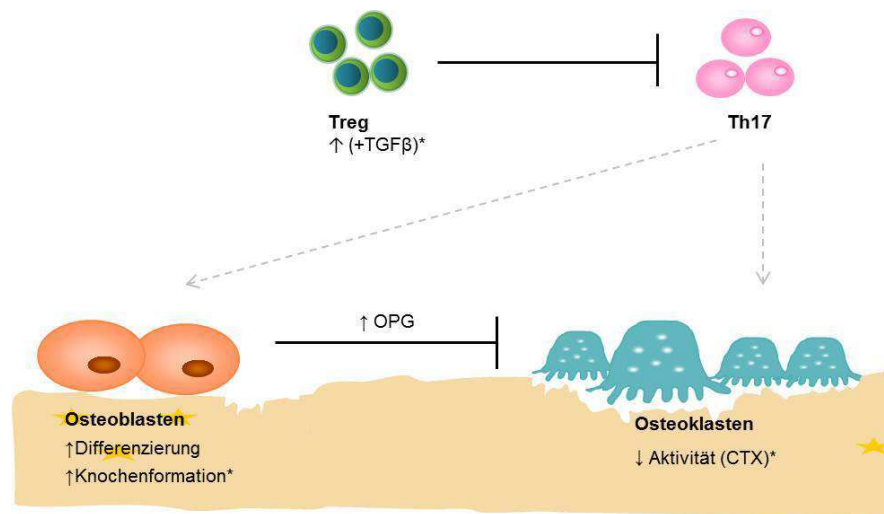


Abbildung 5.1: Eine Skizze zu den postulierten Auswirkungen einer Niedrig-Dosis Therapie auf den Knochenmetabolismus. Die Differenzierung von Osteoblasten wird über die Expression von RUNX2 und die Knochenformation über BSP und Osteocalcin beschleunigt. Eine Zunahme der Knochendichte wurde *in vivo* ebenfalls festgestellt. Die Aktivität der Osteoklasten wird direkt durch Bestrahlung sowie durch vermehrtes Freisetzen von OPG nach Bestrahlung durch Osteoblasten inhibiert. Dies wurde durch ein erniedrigtes Kollagenfragmenten-Serumlevel (CTX) in Patienten bestätigt. Immunsuppressive Tregs sind Antagonisten zur entzündlichen Th17. Die Frequenz der Treg Zellen steigt nach Bestrahlung und korreliert mit erhöhten Werten in Patienten nach Therapie. \*: *in vivo*.



## Kapitel 6

# Anhang

Tabelle 6.1: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Acetat-Puffer	0,2 M Sodium Acetat Essigsäure, 0,2 M 1:2 v/v in Millipore-H <sub>2</sub> O
Blocking-Puffer	Milchpulver, 5% in TBST
Elektrophorese-Puffer	Tris-Base, 3,3 g Glycin, 14,26 g SDS, 1 g in 1 L Millipore-H <sub>2</sub> O
Mercaptoethanol-SDS-Probenpuffer	Bromphenolblau, 0,035 g Glycerol, 7 ml SDS, 6ml (10% v/w) Tris-HCl, 1ml (1 M, pH=6,7) 2-Mercaptoethanol, 1%( v/v)
RIPA-Lysepuffer	Igepal-Puffer, 1 % Natriumdeoxycholat, 0,5 % Natriumfluorid, 50 mM AEBSF, 1 mM Aprotinin, 1 µg/mL Natrium-Orthovanadat, 1 mM SDS, 0,1 % in Millipore-H <sub>2</sub> O
RBC-Lysepuffer	NH <sub>4</sub> Cl, 8,29 g KHCO <sub>3</sub> , 1 g Na <sub>2</sub> EDTA, 37,2 mg in 1 L Millipore-H <sub>2</sub> O

SDS-Laufpuffer	Tris-Base, 3,03 g Glycin, 71,3 g SDS, 1 g in 1 L Millipore-H <sub>2</sub> O pH=7,2-7,4
Sammelgelpuffer	Tris-Base, 0,5 M SDS, 4% (w/v) in Millipore-H <sub>2</sub> O pH=6,7 eingestellt mit HCl
TBST	Tris-HCl, 1% (v/v) 1 M, pH=8,3 NaCl, 5% (v/v) 3 M Tween 20, 0,05% (v/v) in Millipore-H <sub>2</sub> O
Toluidin Blau-Lösung	Toluidin Blau, 2 % (w/v) Zitronensäure, 1 M in Millipore-H <sub>2</sub> O
Transfer-Puffer	Glycin, 11,27 g Tris-HCl, 20 ml SDS, 1g Methanol, 20% (v/v) Millipore-H <sub>2</sub> O, 800 ml
TRAP-Färbelösung	Acetat-Puffer, 0,5 M Natriumtartrat, 0,3 M Naphthol-AS-MX-Phosphatdinatriumsalz, 10 mg/mL Triton X-100, 1 % (v/v) Fast Red Violet Salz, 0,3 mg/mL in Millipore H <sub>2</sub> O
Trenngelpuffer	Tris-Base, 1,5 M SDS, 4% (w/v) in Millipore-H <sub>2</sub> O pH=8,8 eingestellt mit HCl
Tris-HCl	Tris-Base, 1 M in Millipore-H <sub>2</sub> O pH=8,3 eingestellt mit HCl

Tabelle 6.2: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
$\alpha$ -MEM	Biochrom AG
Acrylamid Rotiphorese 30%	Roth
AEBSF, 4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid	Sigma-Aldrich

Ammoniumhydroxid	Firma
Aprotinin	Sigma-Aldrich
APS, Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich
Biocoll	Biochrom AG
CD4-Microbeads	MACS Miltenyi Biotec
DAPI	Serva
Ethanol	Merck
Fast Red Violet Salt	Sigma-Aldrich
Formaldehydlösung	Merk
Fötales Kälberserumalbumin	Biochrom AG
HEPES	Biochrom AG
Igepal CA-630 (NP 40)	Sigma-Aldrich
IL-1 $\beta$	eBioscience
IL-23	eBioscience
Ionomycin	Sigma
L-Glutamin (N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin)	Biochrom AG
M-CSF human	MACS Miltenyi Biotec
Mercaptoethanol	Roth
Methanol	Merck
Methylenblau	Roth
Milchpulver	Roth
Naphthol-AS-MX-Phosphatdinatriumsalz	Sigma
Natriumchlorid	Merk
Natriumfluorid	Merk
Natriumtartrat	Sigma
Natriumorthovanadat	Firma
PBS <sup>-/-</sup> Dulbecco (ohne Calcium und Magnesium)	Biochrom AG
PBS <sup>-/-</sup> -EDTA	Biochrom AG
Penicillin/Streptomycin	Firma
Phalloidin-FITC	Sigma-Aldrich
Phorbol-12-myristat-13-acetat	eBioscience
Pierce ECL Plus	Thermo Fisher Scientific
pNitrophenol	Fluka
pNitrophenyl Phosphate Liquid Substrate	Sigma-Aldrich
QuantiTect Primer Assay Hs GAPDH1SG	Qiagen
QuantiTect Primer Assay Hs TNFSF111SG	Qiagen
QuantiTect Primer Assay Hs TNFRSF11B1SG	Qiagen
QuantiTect Primer Assay Hs Runx21SG	Qiagen
QuantiTect Primer Assay Hs IBSP1SG	Qiagen
QuantiTect Primer Assay Hs SP71SG	Qiagen
QuantiTect Primer Assay Hs Osteocalcin1SG	Qiagen
RPML-1640 Medium	Biochrom AG



Rotiquant Coomassie Brilliant Blue Dye	Roth
SDS, Natriumdodecylsulfat	Sigma
sRANKL	PeptoTech
TEMED	Sigma
TGF $\beta$	R&D Systems
TNF $\alpha$	R&D Systems
Toluidin Blau	Fluka
Tris-Base	Sigma
Triton X-100	Sigma-Aldrich
X-Vivo-Medium	Lonza
Zitronensäure	Roth

Tabelle 6.3: Zellkulturmedien

Monozyten-Medium	Lymphozyten-Medium
Autologes Serum, 20 % L-Glutamin, 2 mM HEPES, 10 mM Penicillin/Streptomycin, 1 % in X-Vivo Medium	Fötales Kälberserumalbumin, 20 % L-Glutamin, 2 mM HEPES, 10 mM Penicillin/Streptomycin, 1 % in RPMI-1640 Medium
PBL-Medium mit Zytokinen	Osteoklasten-Differenzierungsmedium
Penicillin/Streptomycin, 1 % Fötales Kälberserumalbumin, 20 % L-Glutamin, 2 mM anti-CD28, 2 µg/mL IL-23, 25 ng/mL IL-1β, 12,5 ng/mL TGFβ, 10 ng/mL TNFα, 2 ng/mL in RPMI-1640 Medium	Penicillin/Streptomycin, 1 % Fötales Kälberserumalbumin, 10 % L-Glutamin, 2 mM sRANKL, 40 ng/mL M-CSF, 25 ng/mL  in α-MEM
MSC-Medium	Osteoblasten-Medium
Fötales Kälberserumalbumin, 10 % HEPES, 10 mM Penicillin/Streptomycin, 1 %  in DMEM Medium	Fötales Kälberserumalbumin, 10 % HEPES, 10 mM Penicillin/Streptomycin, 1 % Ascorbinsäure, 50 µM β-Glucosphosphat, 10 µM Dexamethason, 10 <sup>-8</sup> M in DMEM Medium
Adipozyten-Medium	Chondrozyten-Medium
Fötales Kälberserumalbumin, 10 % L-Glutamin, 2 mM Penicillin/Streptomycin, 1 % Insulin, 10 µg/ml Dexamethason, 1 µM  in α-MEM Medium	Fötales Kälberserumalbumin, 10 % Natriumpiruvat, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Glukose, 5,5 g/l Dexamethason, 0,1 µM L-Prolin, 40 µg/ml Ascorbinsäure, 50 µg/ml ITS <sup>+</sup> , 1:100 v/v in DMEM Medium

Tabelle 6.4: Färbelösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Alcian Blau Färbelösung 8GX	gebrauchsfertig von Fluka
Alizarin Red S Färbelösung	2g Alizarin Red S in 100 ml Millipore-H <sub>2</sub> O pH=4,1-4,3 mit NH <sub>4</sub> OH einstellen
Oil Red O-Färbelösung	300mg in 100ml 99% Isopropanol 1:3 v/v in Millipore-H <sub>2</sub> O

Tabelle 6.5: Antikörper

Antigen	MW Antigen [kDA]	Verdünnung	Spezies	Firma
c-Src	60	1:1000	Maus	Santa Cruz Biotechnology
Cathepsin K	39	1:100	Maus	Santa Cruz Biotechnology
GAPDH	37	1:1000	Hase	Cell Signaling
TRAP	37	1:1000	Hase	Abcam
CD28			human	eBioscience
CD3			human	eBioscience
CD14			human	Miltenyi Biotec
Fc-Teil Maus		1:10000		Santa Cruz Biotechnology
Fc-Teil Hase		1:10000		Santa Cruz Biotechnology

Tabelle 6.6: Antikörper-Kits

Bezeichnung	Hersteller
RevertAid First Stran cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific
RNeasy Mini Kit	Qiagen
QuantiFast SYBR Green PCR Kit	Qiagen
Human Th17/Treg Phenotyping Kit	BD Biosciences
MSC Phenotyping Kit	Miltenyi Biotec
AnnexinV/ Dead Cell Apoptosis Kit	Life Technologies

Tabelle 6.7: Elisa Kits

Bezeichnung	Hersteller
human Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Treg 18plex Assay	eBioscience
OPG	Immundiagnostik
ampli-sRANKL	Biomedica Medizinprodukte GmbH
Ostase-BAP EIA	Innumdiagnostic Systems Ltd
Serum CrossLaps	Innumdiagnostic Systems Ltd
TRAP	B-Bridge International Inc
OPG, RANKL Multiplex Flowcytomix	eBioscience

Tabelle 6.8: Verbrauchsgegenstände

Gegenstand	Bezeichnung	Firma
Einwegpipette 2 mL	Serological Pipette	Sarstedt
Einwegpipette 5 mL	Serological Pipette	Sarstedt
Einwegpipette 10 mL	Serological Pipette	Sarstedt
Einwegpipette 25 mL	Serological Pipette	Sarstedt
LS-Säulen für MACS	LS-Säulen	MACS Miltenyi Biotec
Mehrkanalpipette	Research Plus	Eppendorf
Mikrotiterplatten für Proteinassays	b	NUNC
Mikrotiterplatten für Zellkultur	Zellkulturtestplatten	TPP
Parafilm	Parafilm M	Pechiney Plastic Packaging
Petrischalen 35 mm	Nuncun	NUNC
Pipettierhilfe	accu jet pro	Brand
Reaktionsgefäße	0,5-2 mL	Eppendorf
Reaktionsgefäße	15-50 mL	TPP
Reaktionsgefäße	Durchflusszytometrie	BD Biosciences
Zellkulturflasche	T75 cm <sup>2</sup>	BD Falcon
Zellschaber	S	TPP

Tabelle 6.9: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Firma
Analysesystem für magnetische Beads	Luminex MagPix	Affymetrix
Autoklav	EL	Tutthauer Systec
Brutschrank	BBD6220	Heraeus Scientific
CCD-Kamera für Western Blots	Fusion Fx	Peqlab
Dosimeter	SN54	PTW Freiburg
Durchflusszytometer	FACS Canto II	BD Biosciences
DSLR-Kamera für Mikroskopbilder	xy	Olympus
Elektrophorese-Apparatur mit Zubehör	Miniprotean Tetra System	Biorad
Eismaschine	Flake line	Wessamat
Mikroskop	BX61	Olympus
Millipore-H <sub>2</sub> O-Anlage	ELGA	Veolia
Photometer	ELx808	Biotec
Röntgenröhre	Isovolt DS1	Seifert
Selektionsapparatur für magnetische Beads	QuadroMACS	MACS Miltenyi Biotec
Transfer-Apparatur für Western Blot	Bezeichnung	Firma
Ultraschallbad	Bioruptor UCD-200	Diagenode SA
Wasserbad	Bezeichnung	Firma
Zentrifuge	Multifuge 3 S-R	Thermo scientific
Zentrifuge	Fresco 17	Thermo scientific
Zellzähler	Cell counter Z2	Beckman Coulter



# Literaturverzeichnis

- [1] B. L. Specker. “Evidence for an interaction between calcium intake and physical activity on changes in bone mineral density”. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 11.10 (1996), pp. 1539–1544. ISSN: 0884-0431. DOI: 10.1002/jbmr.5650111022.
- [2] Stephen C. Cowin. *Bone mechanics handbook*. 2nd ed. Boca Raton and FL: CRC Press, 2001. ISBN: 0849391172.
- [3] Frederic Martini, Judi Lindsley Nath, and Edwin F. Bartholomew. *Fundamentals of anatomy & physiology*. 9th ed. San Francisco: Benjamin Cummings, ©2012. ISBN: 0321709330.
- [4] Gerard J. Tortora and Bryan H. Derrickson. *Anatomie und Physiologie*. Weinheim: Wiley-VCH-Verl., 2008. ISBN: 3527325107.
- [5] John D. Currey. *Bones: Structure and mechanics*. [2nd ed.] Princeton, N.J, and Oxford: Princeton University Press, 2006. ISBN: 0691128049.
- [6] S. G. Moore and K. L. Dawson. “Red and yellow marrow in the femur: age-related changes in appearance at MR imaging”. *Radiology* 175.1 (1990), pp. 219–223. ISSN: 0033-8419. DOI: 10.1148/radiology.175.1.2315484.
- [7] R. Civitelli and K. Ziambaras. “Calcium and phosphate homeostasis: concerted interplay of new regulators”. *Journal of endocrinological investigation* 34.7 Suppl (2011), pp. 3–7. ISSN: 1720-8386.
- [8] Xu Cao and Di Chen. “The BMP signaling and in vivo bone formation”. *Gene* 357.1 (2005), pp. 1–8. ISSN: 0378-1119. DOI: 10.1016/j.gene.2005.06.017.
- [9] Timothy F. Day et al. “Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis”. *Developmental cell* 8.5 (2005), pp. 739–750. ISSN: 1534-5807. DOI: 10.1016/j.devcel.2005.03.016.
- [10] Fina Liu, Luc Malaval, and Jane E. Aubin. “Global amplification polymerase chain reaction reveals novel transitional stages during osteoprogenitor differentiation”. *Journal of cell science* 116.Pt 9 (2003), pp. 1787–1796. ISSN: 0021-9533.
- [11] Lingling Xian et al. “Matrix IGF-1 maintains bone mass by activation of mTOR in mesenchymal stem cells”. *Nature Medicine* 18.7 (2012), pp. 1095–1101. ISSN: 1078-8956. DOI: 10.1038/nm.2793.

- [12] Toshihisa Komori. "Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors". *Journal of Cellular Biochemistry* 99.5 (2006), pp. 1233–1239. ISSN: 07302312. DOI: 10.1002/jcb.20958.
- [13] Kazuhisa Nakashima et al. "The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation". *Cell* 108.1 (2002), pp. 17–29. ISSN: 0092-8674.
- [14] Catriona Y. Logan and Roel Nusse. "The Wnt signaling pathway in development and disease". *Annual review of cell and developmental biology* 20 (2004), pp. 781–810. ISSN: 1081-0706. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126.
- [15] P. Ducy et al. "Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation". *Cell* 89.5 (1997), pp. 747–754. ISSN: 0092-8674.
- [16] Takako Koga et al. "NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation". *Nature medicine* 11.8 (2005), pp. 880–885. ISSN: 1078-8956. DOI: 10.1038/nm1270.
- [17] Jane E. Aubin and J. E. Aubin. "Regulation of Osteoblast Formation and Function". *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 2.2 // 1 (2001), pp. 81–94.
- [18] J. C. Crockett et al. "Bone remodelling at a glance". *Journal of Cell Science* 124.7 (2011), pp. 991–998. ISSN: 0021-9533. DOI: 10.1242/jcs.063032.
- [19] F. Patrick Ross and Steven L. Teitelbaum. "alphavbeta3 and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology". *Immunological reviews* 208 (2005), pp. 88–105. ISSN: 0105-2896. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2005.00331.x.
- [20] S. Tanaka et al. "Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors". *Journal of Clinical Investigation* 91.1 (1993), pp. 257–263. ISSN: 0021-9738. DOI: 10.1172/JCI116179.
- [21] R. Felix et al. "Role of colony-stimulating factor-1 in bone metabolism". *Journal of Cellular Biochemistry* 55.3 (1994), pp. 340–349. ISSN: 07302312. DOI: 10.1002/jcb.240550311.
- [22] B. R. Wong et al. "TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src". *Molecular cell* 4.6 (1999), pp. 1041–1049. ISSN: 1097-2765.
- [23] D. M. Anderson et al. "A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function". *Nature* 390.6656 (1997), pp. 175–179. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/36593.
- [24] Hiroshi Takayanagi et al. "Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts". *Developmental cell* 3.6 (2002), pp. 889–901. ISSN: 1534-5807.
- [25] B. R. Wong et al. "The TRAF family of signal transducers mediates NF-kappaB activation by the TRANCE receptor". *The Journal of biological chemistry* 273.43 (1998), pp. 28355–28359. ISSN: 0021-9258.

- [26] N. Kobayashi et al. "Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis". *The EMBO journal* 20.6 (2001), pp. 1271–1280. ISSN: 0261-4189. DOI: 10.1093/emboj/20.6.1271.
- [27] W. S. Simonet et al. "Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density". *Cell* 89.2 (1997), pp. 309–319. ISSN: 0092-8674.
- [28] C. Lowe et al. "Osteopetrosis in Src-deficient mice is due to an autonomous defect of osteoclasts". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90.10 (1993), pp. 4485–4489. ISSN: 0027-8424.
- [29] U. Kornak et al. "Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man". *Cell* 104.2 (2001), pp. 205–215. ISSN: 0092-8674.
- [30] A. Frattini et al. "Defects in TCIRG1 subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis". *Nature genetics* 25.3 (2000), pp. 343–346. ISSN: 1061-4036. DOI: 10.1038/77131.
- [31] P. Saftig et al. "Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95.23 (1998), pp. 13453–13458. ISSN: 0027-8424.
- [32] O. Alper and E. T. Bowden. "Novel insights into c-Src". *Current pharmaceutical design* 11.9 (2005), pp. 1119–1130. ISSN: 1381-6128.
- [33] Martin P. Playford and Michael D. Schaller. "The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology". *Oncogene* 23.48 (2004), pp. 7928–7946. ISSN: 0950-9232. DOI: 10.1038/sj.onc.1208080.
- [34] P. T. Lakkakorpi et al. "Abnormal localisation and hyperclustering of (alpha)(V)(beta)(3) integrins and associated proteins in Src-deficient or tyrphostin A9-treated osteoclasts". *Journal of cell science* 114.Pt 1 (2001), pp. 149–160. ISSN: 0021-9533.
- [35] A. Sanjay et al. "Cbl associates with Pyk2 and Src to regulate Src kinase activity, alpha(v)beta(3) integrin-mediated signaling, cell adhesion, and osteoclast motility". *The Journal of cell biology* 152.1 (2001), pp. 181–195. ISSN: 0021-9525.
- [36] B. F. Boyce et al. "Requirement of pp60c-src expression for osteoclasts to form ruffled borders and resorb bone in mice". *The Journal of clinical investigation* 90.4 (1992), pp. 1622–1627. ISSN: 0021-9738. DOI: 10.1172/JCI116032.
- [37] S. Ahn et al. "Src-mediated tyrosine phosphorylation of dynamin is required for beta2-adrenergic receptor internalization and mitogen-activated protein kinase signaling". *The Journal of biological chemistry* 274.3 (1999), pp. 1185–1188. ISSN: 0021-9258.
- [38] W. Kafienah et al. "Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix". *The Biochemical journal* 331 ( Pt 3) (1998), pp. 727–732. ISSN: 0264-6021.
- [39] S. Corisdeo et al. "New insights into the regulation of cathepsin K gene expression by osteoprotegerin ligand". *Biochemical and biophysical research communications* 285.2 (2001), pp. 335–339. ISSN: 0006-291X. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5127.



- [40] Masataka Asagiri and Hiroshi Takayanagi. "The molecular understanding of osteoclast differentiation". *Bone* 40.2 (2007), pp. 251–264. ISSN: 8756-3282. DOI: 10.1016/j.bone.2006.09.023.
- [41] Bruce R. Troen. "The regulation of cathepsin K gene expression". *Annals of the New York Academy of Sciences* 1068 (2006), pp. 165–172. ISSN: 0077-8923. DOI: 10.1196/annals.1346.018.
- [42] B. F. Boyce. "Advances in the Regulation of Osteoclasts and Osteoclast Functions". *Journal of Dental Research* 92.10 (2013), pp. 860–867. ISSN: 0022-0345. DOI: 10.1177/0022034513500306.
- [43] Maria J. Martínez-Calatrava et al. "RANKL synthesized by articular chondrocytes contributes to juxta-articular bone loss in chronic arthritis". *Arthritis Research & Therapy* 14.3 (2012), R149. ISSN: 1478-6354. DOI: 10.1186/ar3884.
- [44] Yalei Wu et al. "Synovial fibroblasts promote osteoclast formation by RANKL in a novel model of spontaneous erosive arthritis". *Arthritis and rheumatism* 52.10 (2005), pp. 3257–3268. ISSN: 0004-3591. DOI: 10.1002/art.21354.
- [45] L. Lum et al. "Evidence for a Role of a Tumor Necrosis Factor- (TNF- )-converting Enzyme-like Protease in Shedding of TRANCE, a TNF Family Member Involved in Osteoclastogenesis and Dendritic Cell Survival". *Journal of Biological Chemistry* 274.19 (1999), pp. 13613–13618. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.274.19.13613.
- [46] Koichi Matsuo and Naoko Irie. "Osteoclast–osteoblast communication". *Archives of Biochemistry and Biophysics* 473.2 (2008), pp. 201–209. ISSN: 00039861. DOI: 10.1016/j.abb.2008.03.027.
- [47] D. L. Lacey et al. "Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation". *Cell* 93.2 (1998), pp. 165–176. ISSN: 0092-8674.
- [48] H. K. Väänänen et al. "The cell biology of osteoclast function". *Journal of cell science* 113 ( Pt 3) (2000), pp. 377–381. ISSN: 0021-9533.
- [49] R. Baron et al. "Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border". *The Journal of cell biology* 101.6 (1985), pp. 2210–2222. ISSN: 0021-9525.
- [50] G. A. Rodan. "Control of bone formation and resorption: biological and clinical perspective". *Journal of cellular biochemistry. Supplement* 30-31 (1998), pp. 55–61. ISSN: 0733-1959.
- [51] Nicola Dalbeth et al. "Enhanced osteoclastogenesis in patients with tophaceous gout: Urate crystals promote osteoclast development through interactions with stromal cells". *Arthritis & Rheumatism* 58.6 (2008), pp. 1854–1865. ISSN: 00043591. DOI: 10.1002/art.23488.
- [52] M. A. Cimmino et al. "Prevalence of rheumatoid arthritis in Italy: the Chiavari Study". *Annals of the rheumatic diseases* 57.5 (1998), pp. 315–318. ISSN: 0003-4967.

- [53] F. Wolfe et al. "The mortality of rheumatoid arthritis". *Arthritis and rheumatism* 37.4 (1994), pp. 481–494. ISSN: 0004-3591.
- [54] Josef S. Smolen and Günter Steiner. "Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis". *Nature reviews. Drug discovery* 2.6 (2003), pp. 473–488. ISSN: 1474-1776. DOI: 10.1038/nrd1109.
- [55] Josef S. Smolen et al. "New therapies for treatment of rheumatoid arthritis". *Lancet* 370.9602 (2007), pp. 1861–1874. ISSN: 1474-547X. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60784-3.
- [56] Lars Klareskog, Leonid Padyukov, and Lars Alfredsson. "Smoking as a trigger for inflammatory rheumatic diseases". *Current opinion in rheumatology* 19.1 (2007), pp. 49–54. ISSN: 1040-8711. DOI: 10.1097/BOR.0b013e32801127c8.
- [57] M. T. Getts and S. D. Miller. "99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: triggering of autoimmune diseases by infections". *Clinical and experimental immunology* 160.1 (2010), pp. 15–21. ISSN: 0009-9104. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2010.04132.x.
- [58] Henk Visser et al. "How to diagnose rheumatoid arthritis early: a prediction model for persistent (erosive) arthritis". *Arthritis and rheumatism* 46.2 (2002), pp. 357–365. ISSN: 0004-3591.
- [59] Klaus P. Machold et al. "Very recent onset arthritis—clinical, laboratory, and radiological findings during the first year of disease". *The Journal of rheumatology* 29.11 (2002), pp. 2278–2287. ISSN: 0315-162X.
- [60] van der Heijde, D M. "Joint erosions and patients with early rheumatoid arthritis". *British journal of rheumatology* 34 Suppl 2 (1995), pp. 74–78. ISSN: 0263-7103.
- [61] G. A. Schellekens et al. *Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies*. Vol. 101. 1998. DOI: 10.1172/JCI1316.
- [62] Shiva Shahrara et al. "TH-17 cells in rheumatoid arthritis". *Arthritis research & therapy* 10.4 (2008), R93. ISSN: 1478-6362. DOI: 10.1186/ar2477.
- [63] Cai Yue et al. "The effects of adalimumab and methotrexate treatment on peripheral Th17 cells and IL-17/IL-6 secretion in rheumatoid arthritis patients". *Rheumatology international* 30.12 (2010), pp. 1553–1557. ISSN: 1437-160X. DOI: 10.1007/s00296-009-1179-x.
- [64] Marije I. Koenders et al. "Induction of cartilage damage by overexpression of T cell interleukin-17A in experimental arthritis in mice deficient in interleukin-1". *Arthritis and rheumatism* 52.3 (2005), pp. 975–983. ISSN: 0004-3591. DOI: 10.1002/art.20885.
- [65] G. Schett. *Joint remodelling in inflammatory disease*. Vol. 66. 2007. DOI: 10.1136/ard.2007.078972.
- [66] Hiroshi Takayanagi, Sunhwa Kim, and Tadatsugu Taniguchi. "Signaling crosstalk between RANKL and interferons in osteoclast differentiation". *Arthritis Research* 4.Suppl 3 (2002), S227. ISSN: 14659905. DOI: 10.1186/ar581.

- [67] Shigeru Kotake et al. "Human osteoclastogenic T cells and human osteoclastology". *Arthritis & Rheumatism* 60.11 (2009), pp. 3158–3163. ISSN: 00043591. DOI: 10.1002/art.24886.
- [68] Yuhao Gao et al. "IFN-g stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell activation". *Journal of Clinical Investigation* 117.1 (2007), pp. 122–132. ISSN: 0021-9738. DOI: 10.1172/JCI30074.
- [69] Katrien Janssens et al. "Transforming Growth Factor- $\beta$  to the Bone". *Endocrine Reviews* 26.6 (2005), pp. 743–774. ISSN: 0163-769X. DOI: 10.1210/er.2004-0001.
- [70] F. Yoshitake et al. "Interleukin-6 Directly Inhibits Osteoclast Differentiation by Suppressing Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Signaling Pathways". *Journal of Biological Chemistry* 283.17 (2008), pp. 11535–11540. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M607999200.
- [71] Shi Wei et al. "IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis". *Journal of Clinical Investigation* 115.2 (2005), pp. 282–290. ISSN: 0021-9738. DOI: 10.1172/JCI200523394.
- [72] J. P. Pelletier et al. "Synthesis of metalloproteases and interleukin 6 (IL-6) in human osteoarthritic synovial membrane is an IL-1 mediated process". *The Journal of rheumatology. Supplement* 43 (1995), pp. 109–114. ISSN: 0380-0903.
- [73] Johannes Pfeilschifter et al. "Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclastlike cells in vitro". *Journal of Bone and Mineral Research* 4.1 (1989), pp. 113–118. ISSN: 08840431. DOI: 10.1002/jbmr.5650040116.
- [74] M. Feldmann, F. M. Brennan, and R. N. Maini. "Role of cytokines in rheumatoid arthritis". *Annual review of immunology* 14 (1996), pp. 397–440. ISSN: 0732-0582. DOI: 10.1146/annurev.immunol.14.1.397.
- [75] F. M. Brennan et al. "Inhibitory effect of TNF  $\alpha$  antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis". *Lancet* 2.8657 (1989), pp. 244–247. ISSN: 1474-547X.
- [76] Iain B. McInnes and Georg Schett. "Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis". *Nature Reviews Immunology* 7.6 (2007), pp. 429–442. ISSN: 1474-1733. DOI: 10.1038/nri2094.
- [77] P. C. Heinrich et al. "Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway". *The Biochemical journal* 334 ( Pt 2) (1998), pp. 297–314. ISSN: 0264-6021.
- [78] Frank Lally et al. "A novel mechanism of neutrophil recruitment in a coculture model of the rheumatoid synovium". *Arthritis and rheumatism* 52.11 (2005), pp. 3460–3469. ISSN: 0004-3591. DOI: 10.1002/art.21394.
- [79] Estelle Bettelli et al. "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells". *Nature* 441.7090 (2006), pp. 235–238. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/nature04753.
- [80] Li Yang et al. "IL-21 and TGF- $\beta$  are required for differentiation of human TH17 cells". *Nature* 454.7202 (2008), pp. 350–352. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/nature07021.

- [81] Y. Katz, O. Nativ, and Y. Beer. "Interleukin-17 enhances tumor necrosis factor alpha-induced synthesis of interleukins 1,6, and 8 in skin and synovial fibroblasts: a possible role as a "fine-tuning cytokine" in inflammation processes". *Arthritis and rheumatism* 44.9 (2001), pp. 2176–2184. ISSN: 0004-3591.
- [82] D. V. Jovanovic et al. "IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages". *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 160.7 (1998), pp. 3513–3521. ISSN: 0022-1767.
- [83] Josien, R. , Wong, BR., Li, HL., Steinman, RM., Choi, Y. "TRANCE, a TNF Family Member, Is Differentially Expressed on T Cell Subsets and Induces Cytokine Production in Dendritic Cells". *J Immunol (the Journal of Immunology)* 162 (1999), pp. 2562–2568.
- [84] Ewa M. Paleolog. "Angiogenesis in rheumatoid arthritis". *Arthritis Research* 4.Suppl 3 (2002), S81. ISSN: 14659905. DOI: 10.1186/ar575.
- [85] Hideko Nakahara et al. "Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis". *Arthritis and rheumatism* 48.6 (2003), pp. 1521–1529. ISSN: 0004-3591. DOI: 10.1002/art.11143.
- [86] María-Eugenia Miranda-Carús et al. "Peripheral blood T lymphocytes from patients with early rheumatoid arthritis express RANKL and interleukin-15 on the cell surface and promote osteoclastogenesis in autologous monocytes". *Arthritis & Rheumatism* 54.4 (2006), pp. 1151–1164. ISSN: 00043591. DOI: 10.1002/art.21731.
- [87] Souad Djaafar et al. "Inhibition of T cell-dependent and RANKL-dependent osteoclastogenic processes associated with high levels of bone mass in interleukin-15 receptor-deficient mice". *Arthritis & Rheumatism* 62.11 (2010), pp. 3300–3310. ISSN: 00043591. DOI: 10.1002/art.27645.
- [88] Manali S. Bendre et al. "Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease". *Bone* 33.1 (2003), pp. 28–37. ISSN: 87563282. DOI: 10.1016/S8756-3282(03)00086-3.
- [89] Yoichiro Nakano et al. "Interleukin-4 inhibits spontaneous and parathyroid hormone-related protein-stimulated osteoclast formation in mice". *Journal of Bone and Mineral Research* 9.10 (1994), pp. 1533–1539. ISSN: 08840431. DOI: 10.1002/jbmr.5650091005.
- [90] Dawen Liu, Shaomian Yao, and Gary E. Wise. "Effect of interleukin-10 on gene expression of osteoclastogenic regulatory molecules in the rat dental follicle". *European journal of oral sciences* 114.1 (2006), pp. 42–49. ISSN: 0909-8836. DOI: 10.1111/j.1600-0722.2006.00283.x.
- [91] T. Sunyer et al. "Proinflammatory agents, IL-8 and IL-10, upregulate inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in avian osteoclast-like cells". *Journal of Cellular Biochemistry* 60.4 (1996), pp. 469–483. ISSN: 07302312. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4644(19960315)60:4<469::AID-JCB4>3.0.CO;2-Q.
- [92] Yi Tang et al. "TGF-b1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation". *Nature Medicine* 15.7 (2009), pp. 757–765. ISSN: 1078-8956. DOI: 10.1038/nm.1979.

- [93] Li-Chun Wei et al. "Low-dose radiation stimulates Wnt/b-catenin signaling, neural stem cell proliferation and neurogenesis of the mouse hippocampus in vitro and in vivo". *Current Alzheimer research* 9.3 (2012), pp. 278–289. ISSN: 1875-5828.
- [94] Lars E. Theill, William J. Boyle, and Josef M. Penninger. "RANK-L AND RANK: T Cells, Bone Loss, and Mammalian Evolution". *Annual Review of Immunology* 20.1 (2002), pp. 795–823. ISSN: 0732-0582. DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.100301.064753.
- [95] Casey T. Weaver et al. "Th17: An Effector CD4 T Cell Lineage with Regulatory T Cell Ties". *Immunity* 24.6 (2006), pp. 677–688. ISSN: 10747613. DOI: 10.1016/j.immuni.2006.06.002.
- [96] Birgit Frischholz et al. "Reduced secretion of the inflammatory cytokine IL-1b by stimulated peritoneal macrophages of radiosensitive Balb/c mice after exposure to 0.5 or 0.7 Gy of ionizing radiation". *Autoimmunity* 46.5 (2013), pp. 323–328. ISSN: 1607-842X. DOI: 10.3109/08916934.2012.747522.
- [97] Angelika Moder et al. "Effect of combined Low-Dose Radon- and Hyperthermia Treatment (LDRnHT) of patients with ankylosing spondylitis on serum levels of cytokines and bone metabolism markers: a pilot study". *International Journal of Low Radiation* 7.6 (2010), p. 423. ISSN: 1477-6545. DOI: 10.1504/IJLR.2010.037663.
- [98] Janja Zupan, Matjaz Jeras, and Janja Marc. "Osteoimmunology and the influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts". *Biochemia Medica* (2013), pp. 43–63. ISSN: 18467482. DOI: 10.11613/BM.2013.007.
- [99] Sven Teschner and Volker Burst. "Leflunomide: a drug with a potential beyond rheumatology". *Immunotherapy* 2.5 (2010), pp. 637–650. ISSN: 1750-743X. DOI: 10.2217/imt.10.52.
- [100] Srinivasan Madhusudan et al. "Study of etanercept, a tumor necrosis factor-alpha inhibitor, in recurrent ovarian cancer". *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23.25 (2005), pp. 5950–5959. ISSN: 0732-183X. DOI: 10.1200/JCO.2005.04.127.
- [101] Jonathan Zalevsky et al. "Dominant-negative inhibitors of soluble TNF attenuate experimental arthritis without suppressing innate immunity to infection". *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179.3 (2007), pp. 1872–1883. ISSN: 0022-1767.
- [102] D. L. Scott and G. H. Kingsley. "Tumor necrosis factor inhibitors for rheumatoid arthritis". *The New England journal of medicine* 355.7 (2006), pp. 704–712. ISSN: 1533-4406. DOI: 10.1056/NEJMct055183.
- [103] Edward C. Keystone. "Strategies to control disease in rheumatoid arthritis with tumor necrosis factor antagonists-an opportunity to improve outcomes". *Nature clinical practice. Rheumatology* 2.11 (2006), pp. 594–601. ISSN: 1745-8382. DOI: 10.1038/ncprheum0340.

- [104] A. Lügering et al. "Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway". *Gastroenterology* 121.5 (2001), pp. 1145–1157. ISSN: 0016-5085.
- [105] T. ten Hove et al. "Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease". *Gut* 50.2 (2002), pp. 206–211. ISSN: 0017-5749.
- [106] Stanley Cohen et al. "Treatment of rheumatoid arthritis with anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, in combination with methotrexate: results of a twenty-four-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial". *Arthritis and rheumatism* 46.3 (2002), pp. 614–624. ISSN: 0004-3591. DOI: 10.1002/art.10141.
- [107] Norihiro Nishimoto and Tadamitsu Kishimoto. "Inhibition of IL-6 for the treatment of inflammatory diseases". *Current opinion in pharmacology* 4.4 (2004), pp. 386–391. ISSN: 1471-4892. DOI: 10.1016/j.coph.2004.03.005.
- [108] P. Emery et al. "IL-6 receptor inhibition with tocilizumab improves treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis refractory to anti-tumour necrosis factor biologicals: results from a 24-week multicentre randomised placebo-controlled trial". *Annals of the rheumatic diseases* 67.11 (2008), pp. 1516–1523. ISSN: 0003-4967. DOI: 10.1136/ard.2008.092932.
- [109] Stanley B. Cohen et al. "Denosumab treatment effects on structural damage, bone mineral density, and bone turnover in rheumatoid arthritis: A twelve-month, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II clinical trial". *Arthritis & Rheumatism* 58.5 (2008), pp. 1299–1309. ISSN: 00043591. DOI: 10.1002/art.23417.
- [110] J. C. Frith et al. "The molecular mechanism of action of the antiresorptive and antiinflammatory drug clodronate: evidence for the formation in vivo of a metabolite that inhibits bone resorption and causes osteoclast and macrophage apoptosis". *Arthritis and rheumatism* 44.9 (2001), pp. 2201–2210. ISSN: 0004-3591.
- [111] M. Heinrich Seegenschmiedt, Oliver Micke, and Norman Willich. "Radiation Therapy for Nonmalignant Diseases in Germany". *Strahlentherapie und Onkologie* 180.11 (2004), pp. 718–730. ISSN: 0179-7158. DOI: 10.1007/s00066-004-9197-9.
- [112] K. D. Budras, K. Hartung, and B. M. Münzer. "Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Einfluss von Röntgenbestrahlung auf das Stratum synoviale des entzündeten Kniegelenks". *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* 99.5 (1986), pp. 148–152. ISSN: 0005-9366.
- [113] U. Fischer et al. "Effekte einer niedrig dosierten Co-60-Bestrahlung auf den Verlauf einer aseptischen Arthritis am Kniegelenk des Kaninchens". *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Röntgengesellschaft ... [et al]* 174.12 (1998), pp. 633–639. ISSN: 0179-7158.
- [114] G. Hildebrandt et al. "Effects of low dose radiation therapy on adjuvant induced arthritis in rats". *International journal of radiation biology* 76.8 (2000), pp. 1143–1153. ISSN: 1362-3095.



- [115] G. Hildebrandt et al. “Low-dose radiotherapy (LD-RT) and the modulation of iNOS expression in adjuvant-induced arthritis in rats”. *International journal of radiation biology* 79.12 (2003), pp. 993–1001. ISSN: 1362-3095. DOI: 10.1080/09553000310001636639.
- [116] K. R. Trott, R. Parker, and M. P. Seed. “Die Wirkung von Röntgenstrahlen auf die experimentelle Arthritis der Ratte”. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Röntgengesellschaft ... [et al]* 171.9 (1995), pp. 534–538. ISSN: 0179-7158.
- [117] Guido Hildebrandt et al. “Inhibition of the iNOS pathway in inflammatory macrophages by low-dose X-irradiation in vitro. Is there a time dependence?” *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Röntgengesellschaft ... [et al]* 179.3 (2003), pp. 158–166. ISSN: 0179-7158. DOI: 10.1007/s00066-003-1044-x.
- [118] Hiroko Nakatsukasa et al. “Repeated Gamma Irradiation Attenuates Collagen-Induced Arthritis via Up-regulation of Regulatory T Cells but not by Damaging Lymphocytes Directly”. *Radiation Research* 174.3 (2010), pp. 313–324. ISSN: 0033-7587. DOI: 10.1667/RR2121.1.
- [119] Mitsutoshi Tsukimoto et al. “Repeated 0.5-Gy gamma irradiation attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis with up-regulation of regulatory T cells and suppression of IL17 production”. *Radiation research* 170.4 (2008), pp. 429–436. ISSN: 1938-5404.
- [120] D. Schaue, B. Marples, and K. R. Trott. “The effects of low-dose X-irradiation on the oxidative burst in stimulated macrophages”. *International Journal of Radiation Biology* 78.7 (2002), pp. 567–576. ISSN: 0955-3002. DOI: 10.1080/09553000210126457.
- [121] Meritxell Arenas et al. “Anti-inflammatory effects of low-dose radiotherapy in an experimental model of systemic inflammation in mice”. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 66.2 (2006), pp. 560–567. ISSN: 0360-3016. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2006.06.004.
- [122] Adapa V. Prasad et al. “Activation of Nuclear Factor kB in Human Lymphoblastoid Cells by Low-Dose Ionizing Radiation”. *Radiation Research* 138.3 (1994), p. 367. ISSN: 0033-7587. DOI: 10.2307/3578685.
- [123] M. Martin et al. “Coactivation of AP-1 activity and TGF-beta1 gene expression in the stress response of normal skin cells to ionizing radiation”. *Oncogene* 15.8 (1997), pp. 981–989. ISSN: 0950-9232. DOI: 10.1038/sj.onc.1201433.
- [124] Yagunov A. S., Tokalov S. V., Chukhlovina A. B., Afanassiev B. V. “Animal Studies of Residual Hematopoietic and Immune System Injury from Low Dose/Low Dose Rate Radiation and Heavy Metals.” *Bethesda, MD: Armed Forces Radiobiology Research Institute* 1998 ().
- [125] Thomas M. Seed et al. “Accommodative responses to chronic irradiation: effects of dose, dose rate, and pharmacological response modifiers”. *Military medicine* 167.2 Suppl (2002), pp. 82–86. ISSN: 0026-4075.

- [126] Ahmet Godekmerdan et al. "Diminished cellular and humoral immunity in workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation". *Archives of medical research* 35.4 (2004), pp. 324–328. ISSN: 0188-4409. DOI: 10.1016/j.arcmed.2004.04.005.
- [127] Zygmunt Zdrojewicz and Jadwiga Strzelczyk. "Radon Treatment Controversy". *Dose-Response* 4.2 (2006), pp. 106–118. ISSN: 1559-3258. DOI: 10.2203/dose-response.05-025.Zdrojewicz.
- [128] Deetjen P. and Jockel H. "Gibts es noch Indikationen für eine Therapie mit Radonbädern?" *Internist Prax* 32 (1992), pp. 353–355.
- [129] Hallenbeck WH. Boca Raton and FL: CRC Press, 1994.
- [130] A.Franke et al. "Long-term efficacy of radon spa therapy in rheumatoid arthritis—a randomized, sham-controlled study and follow-up". *Rheumatology* 39.8 (2000), pp. 894–902. ISSN: 14602172. DOI: 10.1093/rheumatology/39.8.894.
- [131] G. Bernatzky and P. Deetjen, eds. *Schmerzhemmende Wirkung einer Kurbehandlung bei PATienten mit Spondylarthritits Ankylopoetica*. Geretsried: I.S.M.H, 1997.
- [132] H. G. Pratzel et al. "Wirksamkeitsnachweis von Radonbädern im Rahmen einer kurortmedizinischen Behandlung des zervikalen Schmerzsyndroms." *Phys. Rehab. Kur. Med.* 3 (1993), pp. 76–82.
- [133] W. Pfaller. "Subzelluläre Veränderungen der Nebennierenrinde nach Inhalation von Radon." *Z Angew Bäder-u. Klimaheilkd* 26 (1979), pp. 384–390.
- [134] G. Gastl, D. Egg, and M. Herold. "Influence of Finnish bath and radon balneotherapy on the frequency and activity of natural killer cells in peripheral blood." *Z Phys Med Baln med Klimatol* 17 (1) (1988), pp. 47–53.
- [135] Eric J. Hall and Amato J. Giaccia. *Radiobiology for the radiologist*. 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2012. ISBN: 1608311937.
- [136] Hanno Krieger. *Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes*. Wiesbaden: Vieweg+Teubner Verlag, 2004. ISBN: ISBN 978-3-663-10226-7.
- [137] M. Scholz. *Effects of Ion Radiation on Cells and Tissues*. Vol. 162. Radiation effects on polymers for biological use, Advances in polymer science. Berlin and New York: Springer, 2003. ISBN: 978-3-540-44020-8. DOI: 10.1007/3-540-45668-6\\_4.
- [138] S. H. Revell. "Relationships between chromosome damage and cell death." *Progress and Topics in Cytogenetics* (1984).
- [139] F. G. SHERMAN and H. QUASTLER. "DNA synthesis in irradiated intestinal epithelium". *Experimental cell research* 19 (1960), pp. 343–360. ISSN: 0014-4827.
- [140] K. N. Prasad. "Differentiation of neuroblastoma cells in culture". *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 50.2 (1975), pp. 129–165. ISSN: 1464-7931.
- [141] H. P. Rodemann et al. "Terminal differentiation of human fibroblasts is induced by radiation". *Scanning microscopy* 5.4 (1991), 1135–42; discussion 1142–3. ISSN: 0891-7035.



- [142] K. Schwenke et al. "Radiation-enhanced differentiation of erythroid progenitor cells and its relation to reproductive cell death". *International journal of radiation biology* 69.3 (1996), pp. 309–317. ISSN: 1362-3095.
- [143] R. Ramírez Chamond, C.A.J., C. Moreno Aguilar, and F. Guerra Pasadas. "Apoptosis and disease". *Alergol. Immunol. Clin.* 14.6 (1999), pp. 367–374.
- [144] E. Ferraro and F. Cecconi. "Autophagic and apoptotic response to stress signals in mammalian cells." *Arch. Biochem. Biophys.* 462.2 (2007), pp. 210–219.
- [145] J. E. Chipuk, L. Bouchier-Hayes, and D. R. Green. "Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario". *Cell Death and Differentiation* 13.8 (2006), pp. 1396–1402. ISSN: 1350-9047. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401963.
- [146] M. Bauer et al. "Human monocytes are severely impaired in base and DNA double-strand break repair that renders them vulnerable to oxidative stress". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.52 (2011), pp. 21105–21110. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.1111919109.
- [147] Andrea Balogh et al. "The effect of ionizing radiation on the homeostasis and functional integrity of murine splenic regulatory T cells". *Inflammation Research* 62.2 (2013), pp. 201–212. ISSN: 1023-3830. DOI: 10.1007/s00011-012-0567-y.
- [148] Albrecht Falkenbach et al. "Radon therapy for the treatment of rheumatic diseases—review and meta-analysis of controlled clinical trials". *Rheumatology international* 25.3 (2005), pp. 205–210. ISSN: 1437-160X. DOI: 10.1007/s00296-003-0419-8.
- [149] Carl A. Gregory et al. "An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction". *Analytical Biochemistry* 329.1 (2004), pp. 77–84. ISSN: 00032697. DOI: 10.1016/j.ab.2004.02.002.
- [150] Serhan Zenger et al. "Proteolytic processing and polarized secretion of tartrate-resistant acid phosphatase is altered in a subpopulation of metaphyseal osteoclasts in cathepsin K-deficient mice". *Bone* 41.5 (2007), pp. 820–832. ISSN: 8756-3282. DOI: 10.1016/j.bone.2007.07.010.
- [151] G. Koopman et al. "Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis". *Blood* 84.5 (1994), pp. 1415–1420. ISSN: 0006-4971.
- [152] S. J. Martin et al. "Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl". *The Journal of experimental medicine* 182.5 (1995), pp. 1545–1556. ISSN: 0022-1007.
- [153] Volker Gerke and Stephen E. Moss. "Annexins: from structure to function". *Physiological reviews* 82.2 (2002), pp. 331–371. ISSN: 0031-9333. DOI: 10.1152/physrev.00030.2001.

- [154] M. Dominici et al. "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." *Cytotherapy* 8.4 (2006), pp. 315–317. ISSN: 1465-3249.
- [155] M. F. Pittenger et al. "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells". *Science (New York, N.Y.)* 284.5411 (1999), pp. 143–147. ISSN: 0036-8075.
- [156] P. Ducy. "Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology". *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 219.4 (2000), pp. 461–471. ISSN: 1058-8388. DOI: 10.1002/1097-0177(2000)9999:9999<:AID-DVDY1074>3.0.CO;2-C.
- [157] G. BAHT, G. HUNTER, and H. GOLDBERG. "Bone sialoprotein–collagen interaction promotes hydroxyapatite nucleation". *Matrix Biology* 27.7 (2008), pp. 600–608. ISSN: 0945053X. DOI: 10.1016/j.matbio.2008.06.004.
- [158] Aurora Patti et al. "Endocrine Actions of Osteocalcin". *International Journal of Endocrinology* 2013.3 (2013), pp. 1–10. ISSN: 1687-8337. DOI: 10.1155/2013/846480.
- [159] Teruhito Yamashita et al. "NF-kappaB p50 and p52 regulate receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) and tumor necrosis factor-induced osteoclast precursor differentiation by activating c-Fos and NFATc1". *The Journal of biological chemistry* 282.25 (2007), pp. 18245–18253. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M610701200.
- [160] Michael H. Ross and Wojciech Pawlina. *Histology: A text and atlas : with correlated cell and molecular biology*. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, 2011. ISBN: 0781772001.
- [161] C. G. Bellows, J. E. Aubin, and J. N. Heersche. "Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate". *Bone and mineral* 14.1 (1991), pp. 27–40. ISSN: 0169-6009.
- [162] Ellis E. Golub. "Role of matrix vesicles in biomineralization". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1790.12 (2009), pp. 1592–1598. ISSN: 03044165. DOI: 10.1016/j.bbagen.2009.09.006.
- [163] Jean-Marie Delaissé et al. "Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities". *Microscopy research and technique* 61.6 (2003), pp. 504–513. ISSN: 1059-910X. DOI: 10.1002/jemt.10374.
- [164] H. Yasuda et al. "Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95.7 (1998), pp. 3597–3602. ISSN: 0027-8424.
- [165] Tsvee Lapidot and Isabelle Petit. "Current understanding of stem cell mobilization: The roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells". *Experimental Hematology* (2002) 973–981 30 (2002), pp. 973–981.
- [166] William J. Boyle, W. Scott Simonet, and David L. Lacey. "Osteoclast differentiation and activation". *Nature* 423 (2003), pp. 337–342. ISSN: 0028-0836.

- [167] S. L. Teitelbaum. “Bone resorption by osteoclasts”. *Science (New York, N.Y.)* 289.5484 (2000), pp. 1504–1508. ISSN: 0036-8075.
- [168] Jeffrey S. Willey et al. “Early increase in osteoclast number in mice after whole-body irradiation with 2 Gy X rays”. *Radiation research* 170.3 (2008), pp. 388–392. ISSN: 1938-5404. DOI: 10.1667/RR1388.1.
- [169] Jonas Klinger. “Entzündungshemmende Effekte von ionisierender Strahlung, untersucht in Co-Kultur Systemen humaner Endothelzellen und Leukozyten”. *Dissertation, TU Darmstadt* (2012).
- [170] T. Izawa et al. “c-Src Links a RANK/  $\alpha$ 3 Integrin Complex to the Osteoclast Cytoskeleton”. *Molecular and Cellular Biology* 32.14 (2012), pp. 2943–2953. ISSN: 0270-7306. DOI: 10.1128/MCB.00077-12.
- [171] Tsuyoshi Miyazaki et al. “The role of c-Src kinase in the regulation of osteoclast function”. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association* 16.2 (2006), pp. 68–74. ISSN: 1439-7595. DOI: 10.1007/s10165-006-0460-z.
- [172] Allison P. Armstrong et al. “A RANK/TRAF6-dependent signal transduction pathway is essential for osteoclast cytoskeletal organization and resorptive function”. *The Journal of biological chemistry* 277.46 (2002), pp. 44347–44356. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M202009200.
- [173] Alison R. Hayman. “Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy”. *Autoimmunity* 41.3 (2008), pp. 218–223. ISSN: 0891-6934. DOI: 10.1080/08916930701694667.
- [174] K. Sato et al. “Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction”. *Journal of Experimental Medicine* 203.12 (2006), pp. 2673–2682. ISSN: 0022-1007. DOI: 10.1084/jem.20061775.
- [175] Hiroshi Takayanagi. “Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems”. *Nature Reviews Immunology* 7.4 (2007), pp. 292–304. ISSN: 1474-1733. DOI: 10.1038/nri2062.
- [176] Hiroyoshi Nishikawa and Shimon Sakaguchi. “Regulatory T cells in tumor immunity”. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 127.4 (2010), pp. 759–767. ISSN: 1097-0215. DOI: 10.1002/ijc.25429.
- [177] Larry W. Moreland and Jeffrey R. Curtis. “Systemic Nonarticular Manifestations of Rheumatoid Arthritis: Focus on Inflammatory Mechanisms”. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 39.2 (2009), pp. 132–143. ISSN: 00490172. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2008.08.003.
- [178] M. Jongen-Lavrencic et al. “Elevated levels of inflammatory cytokines in bone marrow of patients with rheumatoid arthritis and anemia of chronic disease”. *The Journal of rheumatology* 24.8 (1997), pp. 1504–1509. ISSN: 0315-162X.
- [179] Medhat Shehata et al. “Effect of combined spa-exercise therapy on circulating TGF-beta1 levels in patients with ankylosing spondylitis”. *Wiener klinische Wochenschrift* 118.9-10 (2006), pp. 266–272. ISSN: 0043-5325. DOI: 10.1007/s00508-006-0560-y.

- [180] Takashi Maruyama et al. "The molecular mechanisms of Foxp3 gene regulation". *Seminars in immunology* 23.6 (2011), pp. 418–423. ISSN: 1096-3618. DOI: 10.1016/j.smim.2011.06.005.
- [181] Margarida Saraiva and Anne O'Garra. "The regulation of IL-10 production by immune cells". *Nature reviews. Immunology* 10.3 (2010), pp. 170–181. ISSN: 1474-1741. DOI: 10.1038/nri2711.
- [182] Markus J. Seibel. "Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability". *The Clinical biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists* 26.4 (2005), pp. 97–122. ISSN: 0159-8090.
- [183] Tomonori Sakurai et al. "Ionising irradiation-induced inhibition of differentiation of C3H10T1/2 cells to the osteoblastic lineage". *International journal of radiation biology* 87.5 (2011), pp. 447–452. ISSN: 1362-3095. DOI: 10.3109/09553002.2011.542545.
- [184] Xiang Hong Li et al. "REDD1 Protects Osteoblast Cells from Gamma Radiation-Induced Premature Senescence". *PLoS ONE* 7.5 (2012), e36604. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0036604.
- [185] K.-H. v. Wangenheim, H.-P. Peterson, and K. Schwenke. "A Major Component of Radiation Action: Interference with Intracellular Control of Differentiation". *International Journal of Radiation Biology* 68.4 (1995), pp. 369–388. ISSN: 0955-3002. DOI: 10.1080/09553009514551321.
- [186] Karl-Hartmut von Wangenheim and Hans-Peter Peterson. "The role of cell differentiation in controlling cell multiplication and cancer". *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 134.7 (2008), pp. 725–741. ISSN: 0171-5216. DOI: 10.1007/s00432-008-0381-7.
- [187] C. Fournier, W. Kraft-Weyrather, and G. Kraft. "Survival, differentiation and collagen secretion of human fibroblasts after irradiation with carbon ions and X-rays". *Physica medica : PM : an international journal devoted to the applications of physics to medicine and biology : official journal of the Italian Association of Biomedical Physics (AIFB)* 14 Suppl 1 (1998), pp. 44–47. ISSN: 1120-1797.
- [188] P. C. Lara et al. "Radiation-induced differentiation of human skin fibroblasts: relationship with cell survival and collagen production". *International journal of radiation biology* 70.6 (1996), pp. 683–692. ISSN: 1362-3095.
- [189] Nancy N. Baxter. *Risk of Pelvic Fractures in Older Women Following Pelvic Irradiation*. Vol. 294. 2005. DOI: 10.1001/jama.294.20.2587.
- [190] Orit Kollet et al. "Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells". *Nature Medicine* 12.6 (2006), pp. 657–664. ISSN: 1078-8956. DOI: 10.1038/nm1417.
- [191] Jie He et al. "Effects of irradiation on growth and differentiation-related gene expression in osteoblasts". *The Journal of craniofacial surgery* 22.5 (2011), pp. 1635–1640. ISSN: 1536-3732. DOI: 10.1097/SCS.0b013e31822e5f66.

- [192] H. J. Chae et al. "Effect of ionizing radiation on the differentiation of ROS 17/2.8 osteoblasts through free radicals". *Journal of radiation research* 40.4 (1999), pp. 323–335. ISSN: 0449-3060.
- [193] M. Sawajiri et al. "Expression of MMP-13 in osteoblast cells and rat tibia after exposure to gamma rays or accelerated carbon ions". *Physica medica : PM : an international journal devoted to the applications of physics to medicine and biology : official journal of the Italian Association of Biomedical Physics (AIFB)* 23.2 (2007), pp. 73–79. ISSN: 1120-1797. DOI: 10.1016/j.ejmp.2007.03.005.
- [194] J. Y. Choi et al. "Expression patterns of bone-related proteins during osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells". *Journal of Cellular Biochemistry* 61.4 (1996), pp. 609–618. ISSN: 07302312. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4644(19960616)61:4<609::AID-JCB15>3.0.CO;2-A.
- [195] Soon-Sun Park et al. "X-ray radiation at low doses stimulates differentiation and mineralization of mouse calvarial osteoblasts". *BMB reports* 45.10 (2012), pp. 571–576. ISSN: 1976-670X.
- [196] Wei Xu et al. "The effects of low dose X-irradiation on osteoblastic MC3T3-E1 cells in vitro". *BMC Musculoskeletal Disorders* 13.1 (2012), p. 94. ISSN: 1471-2474. DOI: 10.1186/1471-2474-13-94.
- [197] Wook-Young Baek and Jung-Eun Kim. "Transcriptional regulation of bone formation". *Front Biosci (Schol Ed)* 3 (2011), pp. 126–135.
- [198] Toshihisa Komori. "Signaling networks in RUNX2-dependent bone development". *Journal of Cellular Biochemistry* 112.3 (2011), pp. 750–755. ISSN: 07302312. DOI: 10.1002/jcb.22994.
- [199] Jae-Hwan Jeong and Je-Yong Choi. "Interrelationship of Runx2 and estrogen pathway in skeletal tissues". *BMB reports* 44.10 (2011), pp. 613–618. ISSN: 1976-670X.
- [200] Hyun-Nam Kim et al. "Combination of Runx2 and BMP2 increases conversion of human ligamentum flavum cells into osteoblastic cells". *BMB reports* 44.7 (2011), pp. 446–451. ISSN: 1976-670X. DOI: 10.5483/BMBRep.2011.44.7.446.
- [201] Jennifer Baum and Heather S. Duffy. *Fibroblasts and Myofibroblasts: What Are We Talking About?* Vol. 57. 2011. DOI: 10.1097/FJC.0b013e3182116e39.
- [202] Nicole A. Nadlonek et al. "Radiation induces osteogenesis in human aortic valve interstitial cells". *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 144.6 (2012), pp. 1466–1470. ISSN: 00225223. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2012.08.041.
- [203] Linda Gilbert et al. "Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2alpha A) is inhibited by tumor necrosis factor-alpha". *The Journal of biological chemistry* 277.4 (2002), pp. 2695–2701. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M106339200.
- [204] Yoshiaki Ito and Kohei Miyazono. "RUNX transcription factors as key targets of TGF-beta superfamily signaling". *Current opinion in genetics & development* 13.1 (2003), pp. 43–47. ISSN: 0959-437X.



- [205] Faiza Afzal et al. "Smad function and intranuclear targeting share a Runx2 motif required for osteogenic lineage induction and BMP2 responsive transcription". *Journal of cellular physiology* 204.1 (2005), pp. 63–72. ISSN: 0021-9541. DOI: 10.1002/jcp.20258.
- [206] Stan Gronthos et al. "Telomerase accelerates osteogenesis of bone marrow stromal stem cells by upregulation of CBFA1, osterix, and osteocalcin". *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 18.4 (2003), pp. 716–722. ISSN: 0884-0431. DOI: 10.1359/jbmr.2003.18.4.716.
- [207] Chaoxiang Shui et al. "Changes in Runx2/Cbfa1 expression and activity during osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells". *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 18.2 (2003), pp. 213–221. ISSN: 0884-0431. DOI: 10.1359/jbmr.2003.18.2.213.
- [208] Ming Chen et al. "Low-Dose X-Ray Irradiation Promotes Osteoblast Proliferation, Differentiation and Fracture Healing". *PLoS ONE* 9.8 (2014), e104016. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0104016.
- [209] P. V. Hauschka and F. H. Wians. *Osteocalcin-hydroxyapatite interaction in the extra-cellular organic matrix of bone*. Vol. 224. 1989. DOI: 10.1002/ar.1092240208.
- [210] Corinne Niger et al. "The transcriptional activity of osterix requires the recruitment of Sp1 to the osteocalcin proximal promoter". *Bone* 49.4 (2011), pp. 683–692. ISSN: 87563282. DOI: 10.1016/j.bone.2011.07.027.
- [211] X. Tan et al. "Smad4 is required for maintaining normal murine postnatal bone homeostasis". *Journal of Cell Science* 120.13 (2007), pp. 2162–2170. ISSN: 0021-9533. DOI: 10.1242/jcs.03466.
- [212] A. Javed et al. "Structural Coupling of Smad and Runx2 for Execution of the BMP2 Osteogenic Signal". *Journal of Biological Chemistry* 283.13 (2008), pp. 8412–8422. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M705578200.
- [213] Paul Dent et al. "MAPK pathways in radiation responses". *Oncogene* 22.37 (2003), pp. 5885–5896. ISSN: 0950-9232. DOI: 10.1038/sj.onc.1206701.
- [214] P. Bianco et al. "Bone sialoprotein (BSP) secretion and osteoblast differentiation: relationship to bromodeoxyuridine incorporation, alkaline phosphatase, and matrix deposition". *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 41.2 (1993), pp. 183–191. ISSN: 0022-1554. DOI: 10.1177/41.2.8419458.
- [215] Wafa Bouleftour et al. "Blocking the expression of both bone sialoprotein (BSP) and osteopontin (OPN) impairs the anabolic action of PTH in mouse calvaria bone". *Journal of cellular physiology* (2014). ISSN: 0021-9541. DOI: 10.1002/jcp.24772.
- [216] Jing Qiu et al. "Combined effects of g-irradiation and cadmium exposures on osteoblasts in vitro". *Environmental toxicology and pharmacology* 33.2 (2012), pp. 149–157. ISSN: 1872-7077. DOI: 10.1016/j.etap.2011.12.009.

- [217] A. Dare et al. "Effects of ionizing radiation on proliferation and differentiation of osteoblast-like cells". *Journal of dental research* 76.2 (1997), pp. 658–664. ISSN: 0022-0345.
- [218] S. Matsumura et al. "Effect of X-Ray Irradiation on Proliferation and Differentiation of Osteoblast". *Calcified tissue international* 59.4 (1996), pp. 307–308. ISSN: 0171-967X. DOI: 10.1007/s002239900129.
- [219] G. P. Thomas et al. "Changing RANKL/OPG mRNA expression in differentiating murine primary osteoblasts". *The Journal of endocrinology* 170.2 (2001), pp. 451–460. ISSN: 0022-0795.
- [220] Bastian Roth et al. "Low dose photon irradiation alters cell differentiation via activation of hIK channels". *European Journal of Physiology* in print ().
- [221] L. C. Hofbauer, C. A. Kühne, and V. Viereck. "The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases". *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 4.3 (2004), pp. 268–275. ISSN: 1108-7161.
- [222] Gerald J. Atkins et al. "RANKL expression is related to the differentiation state of human osteoblasts". *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 18.6 (2003), pp. 1088–1098. ISSN: 0884-0431. DOI: 10.1359/jbmr.2003.18.6.1088.
- [223] B. R. Wong et al. "TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor". *The Journal of experimental medicine* 186.12 (1997), pp. 2075–2080. ISSN: 0022-1007.
- [224] Hiroshi Takayanagi. "Osteoimmunology and the effects of the immune system on bone". *Nature Reviews Rheumatology* 5.12 (2009), pp. 667–676. ISSN: 1759-4790. DOI: 10.1038/nrrheum.2009.217.
- [225] Masahiko Sawajiri et al. "Different effects of carbon ion and gamma-irradiation on expression of receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand in MC3T3-E1 osteoblast cells". *Bulletin of experimental biology and medicine* 142.5 (2006), pp. 618–624. ISSN: 0007-4888.
- [226] Xiao-chun Bai et al. "Reactive oxygen species stimulates receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand expression in osteoblast". *The Journal of biological chemistry* 280.17 (2005), pp. 17497–17506. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M409332200.
- [227] Till Dettmerring et al. "Increased effectiveness of carbon ions in the production of reactive oxygen species in normal human fibroblasts". *Radiat. Res* in print ().
- [228] Timur Akchurin et al. "Complex Dynamics of Osteoclast Formation and Death in Long-Term Cultures". *PLoS ONE* 3.5 (2008), e2104. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0002104.
- [229] H. Kondo et al. "Total-body irradiation of postpubertal mice with  $^{137}\text{Cs}$  acutely compromises the microarchitecture of cancellous bone and increases osteoclasts". *Radiat. Res* 171.171 // 3 (2009), pp. 283–289. DOI: 10.1667/RR1463.1.

- [230] Kenji Yumoto et al. "Short-term effects of whole-body exposure to (56)fe ions in combination with musculoskeletal disuse on bone cells". *Radiation Research* 173.4 (2010), pp. 494–504. ISSN: 0033-7587. DOI: 10.1667/RR1754.1.
- [231] Michael Goblirsch et al. "Radiation treatment decreases bone cancer pain through direct effect on tumor cells". *Radiation research* 164.4 Pt 1 (2005), pp. 400–408. ISSN: 1938-5404.
- [232] Jean-Philippe Vit et al. "The analgesic effect of low dose focal irradiation in a mouse model of bone cancer is associated with spinal changes in neuro-mediators of nociception". *Pain* 120.1-2 (2006), pp. 188–201. ISSN: 0304-3959. DOI: 10.1016/j.pain.2005.10.033.
- [233] Masahiko Sawajiri, Jun'etsu Mizoe, and Keiji Tanimoto. "Changes in osteoclasts after irradiation with carbon ion particles". *Radiation and Environmental Biophysics* 42.3 (2003), pp. 219–223. ISSN: 0301-634X. DOI: 10.1007/s00411-003-0204-9.
- [234] B. A. Scheven et al. "Effects of ionizing irradiation on formation and resorbing activity of osteoclasts in vitro". *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 53.1 (1985), pp. 72–79. ISSN: 0023-6837.
- [235] Maria Carla Bosco et al. "Monocytes and dendritic cells in a hypoxic environment: Spotlights on chemotaxis and migration". *Immunobiology* 213.9-10 (2008), pp. 733–749. ISSN: 01712985. DOI: 10.1016/j.imbio.2008.07.031.
- [236] Monique Fangradt et al. "Human monocytes and macrophages differ in their mechanisms of adaptation to hypoxia". *Arthritis Research & Therapy* 14.4 (2012), R181. ISSN: 1478-6354. DOI: 10.1186/ar4011.
- [237] Jonathan S. Harrison et al. "Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers". *Blood* 99.1 (2002), p. 394. ISSN: 0006-4971.
- [238] J. S. Lewis et al. "Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms". *Journal of leukocyte biology* 66.6 (1999), pp. 889–900. ISSN: 0741-5400.
- [239] Takayuki Nomura et al. "Tumor necrosis factor stimulates osteoclastogenesis from human bone marrow cells under hypoxic conditions". *Experimental Cell Research* 321.2 (2014), pp. 167–177. ISSN: 00144827. DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.11.020.
- [240] Matthew C. Walsh and Yongwon Choi. "Biology of the TRANCE axis". *Cytokine & Growth Factor Reviews* 14.3-4 (2003), pp. 251–263. ISSN: 13596101. DOI: 10.1016/S1359-6101(03)00027-3.
- [241] Yuan-Ming Sun. "Effect of radiation on the expression of osteoclast marker genes in RAW264.7 cells". *Molecular Medicine Reports* (2012). ISSN: 1791-2997. DOI: 10.3892/mmcr.2012.765.
- [242] A. Suter et al. "Overlapping functions of lysosomal acid phosphatase (LAP) and tartrate-resistant acid phosphatase (Acp5) revealed by doubly deficient mice". *Development (Cambridge, England)* 128.23 (2001), pp. 4899–4910. ISSN: 0950-1991.



- [243] Helen C. Roberts et al. "Altered collagen in tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-deficient mice: a role for TRAP in bone collagen metabolism". *Calcified tissue international* 80.6 (2007), pp. 400–410. ISSN: 0171-967X. DOI: 10.1007/s00223-007-9032-2.
- [244] R. Luukkainen et al. "Synovial fluid acid phosphatase in seropositive and seronegative arthritides". *Clinical and experimental rheumatology* 8.1 (1990), pp. 63–65. ISSN: 0392-856X.
- [245] Chinh N. Tran, Steven K. Lundy, and David A. Fox. "Synovial biology and T cells in rheumatoid arthritis". *Pathophysiology* 12.3 (2005), pp. 183–189. ISSN: 09284680. DOI: 10.1016/j.pathophys.2005.07.005.
- [246] T. Rooney et al. "Synovial tissue interleukin-18 expression and the response to treatment in patients with inflammatory arthritis". *Annals of the rheumatic diseases* 63.11 (2004), pp. 1393–1398. ISSN: 0003-4967. DOI: 10.1136/ard.2003.016428.
- [247] M. Chabaud et al. "Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium". *Arthritis and rheumatism* 42.5 (1999), pp. 963–970. ISSN: 0004-3591. DOI: 10.1002/1529-0131(199905)42:5<963::AID-ANR15>3.0.CO;2-E.
- [248] A. Bucht et al. "Expression of interferon-gamma (IFN-gamma), IL-10, IL-12 and transforming growth factor-beta (TGF-beta) mRNA in synovial fluid cells from patients in the early and late phases of rheumatoid arthritis (RA)". *Clinical and experimental immunology* 103.3 (1996), pp. 357–367. ISSN: 0009-9104.
- [249] Ulrich Feige Iidiko Sarosi Brad Bolon Anna Tafuri Sean Morony Casey Capparelli Ji Li Robin Elliott Susan McCabe Thomas Wong Giuseppe Campagnuolo Erika Moran Earl R. Bogoch Gwyneth Van Linh T. Nguyen Pamela S. Ohashi David L. Lacey Eleanor Fish William J. Boyle Josef M. Penninger Young-Yun Kong. "Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand". *Nature* 402 (1999), pp. 304–309. ISSN: 0028-0836.
- [250] Noriko Komatsu et al. "Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis". *Nature medicine* 20.1 (2014), pp. 62–68. ISSN: 1078-8956. DOI: 10.1038/nm.3432.
- [251] Jinfang Zhu and William E. Paul. "Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors". *Immunological Reviews* 238.1 (2010), pp. 247–262. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00951.x.
- [252] Fionula M. Brennan et al. "Evidence that rheumatoid arthritis synovial T cells are similar to cytokine-activated T cells: involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB pathways in tumor necrosis factor alpha production in rheumatoid arthritis". *Arthritis and rheumatism* 46.1 (2002), pp. 31–41. ISSN: 0004-3591. DOI: 10.1002/1529-0131(200201)46:1<31::AID-ART10029>3.0.CO;2-5.
- [253] Yanyan Qu et al. "2-Gy whole-body irradiation significantly alters the balance of CD4+CD25- T effector cells and CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells in mice". *Cellular and Molecular Immunology* 7.6 (2010), pp. 419–427. ISSN: 1672-7681. DOI: 10.1038/cmi.2010.45.

- [254] Xin Chen et al. "Differential response of murine CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells to dexamethasone-induced cell death". *European journal of immunology* 34.3 (2004), pp. 859–869. ISSN: 0014-2980. DOI: 10.1002/eji.200324506.
- [255] B. E. Anderson. "Recipient CD4+ T cells that survive irradiation regulate chronic graft-versus-host disease". *Blood* 104.5 (2004), pp. 1565–1573. ISSN: 00064971. DOI: 10.1182/blood-2004-01-0328.
- [256] Fumitoshi Tago et al. "Repeated 0.5-Gy gamma irradiation attenuates autoimmune disease in MRL-lpr/lpr mice with suppression of CD3+CD4-CD8-B220+ T-cell proliferation and with up-regulation of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells". *Radiation research* 169.1 (2008), pp. 59–66. ISSN: 1938-5404. DOI: 10.1667/RR1013.1.
- [257] Hugh I. McFarland et al. "Regulatory T Cells in g Irradiation-Induced Immune Suppression". *PLoS ONE* 7.6 (2012), e39092. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0039092.
- [258] M. Martin, J. Lefaix, and S. Delanian. "TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target?" *International journal of radiation oncology, biology, physics* 47.2 (2000), pp. 277–290. ISSN: 0360-3016.
- [259] WanJun Chen et al. "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3". *The Journal of experimental medicine* 198.12 (2003), pp. 1875–1886. ISSN: 0022-1007. DOI: 10.1084/jem.20030152.
- [260] Evelyn L. Kachikwu et al. "Radiation Enhances Regulatory T Cell Representation". *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics* 81.4 (2011), pp. 1128–1135. ISSN: 03603016. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2010.09.034.
- [261] W. Hueber et al. "Effects of AIN457, a Fully Human Antibody to Interleukin-17A, on Psoriasis, Rheumatoid Arthritis, and Uveitis". *Science Translational Medicine* 2.52 (2010), 52ra72. ISSN: 1946-6234. DOI: 10.1126/scitranslmed.3001107.
- [262] Jan Leipe et al. "Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis". *Arthritis & Rheumatism* 62.10 (2010), pp. 2876–2885. ISSN: 00043591. DOI: 10.1002/art.27622.
- [263] Heiner Appel et al. "Analysis of IL-17+ cells in facet joints of patients with spondyloarthritis suggests that the innate immune pathway might be of greater relevance than the Th17-mediated adaptive immune response". *Arthritis Research & Therapy* 13.3 (2011), R95. ISSN: 1478-6354. DOI: 10.1186/ar3370.
- [264] Anna Koc Grazyna Luszczkiewicz Krystyna Ksiezopolska-Pietrzak Ewa Klimczak Hanna Chwalinska-Sadowska Maria Ziolkowska and Wlodzimierz Maslinski. "High Levels of IL-17 in Rheumatoid Arthritis Patients: IL-15 Triggers In Vitro IL-17 Mechanism Production Via Cyclosporin A-Sensitive Mechanism". *J Immunol (the Journal of Immunology)* 164 (2000), pp. 2832–2838.
- [265] Res, Pieter C M et al. "Overrepresentation of IL-17A and IL-22 producing CD8 T cells in lesional skin suggests their involvement in the pathogenesis of psoriasis". *PLoS ONE* 5.11 (2010), e14108. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0014108.

- [266] Jenny L. McGovern et al. "Th17 cells are restrained by Treg cells via the inhibition of interleukin-6 in patients with rheumatoid arthritis responding to anti-tumor necrosis factor antibody therapy". *Arthritis & Rheumatism* 64.10 (2012), pp. 3129–3138. ISSN: 00043591. DOI: 10.1002/art.34565.
- [267] Qian Niu et al. "Disturbed Th17/Treg balance in patients with rheumatoid arthritis". *Rheumatology international* 32.9 (2012), pp. 2731–2736. ISSN: 1437-160X. DOI: 10.1007/s00296-011-1984-x.
- [268] X. Valencia. "TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells". *Blood* 108.1 (2006), pp. 253–261. ISSN: 00064971. DOI: 10.1182/blood-2005-11-4567.
- [269] Faye A. H. Cooles, John D. Isaacs, and Amy E. Anderson. "Treg Cells in Rheumatoid Arthritis: An Update". *Current Rheumatology Reports* 15.9 (2013). ISSN: 1523-3774. DOI: 10.1007/s11926-013-0352-0.
- [270] M. Gengenbacher et al. "Infliximab inhibits bone resorption by circulating osteoclast precursor cells in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis". *Annals of the Rheumatic Diseases* 67.5 (2007), pp. 620–624. ISSN: 0003-4967. DOI: 10.1136/ard.2007.076711.
- [271] N. Kong et al. "Induced T regulatory cells suppress osteoclastogenesis and bone erosion in collagen-induced arthritis better than natural T regulatory cells". *Annals of the Rheumatic Diseases* 71.9 (2012), pp. 1567–1572. ISSN: 0003-4967. DOI: 10.1136/annrheumdis-2011-201052.
- [272] H. Kelchtermans et al. "Activated CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit osteoclastogenesis and collagen-induced arthritis". *Annals of the Rheumatic Diseases* 68.5 (2009), pp. 744–750. ISSN: 0003-4967. DOI: 10.1136/ard.2007.086066.
- [273] Yong Gil Kim et al. "Human CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit the differentiation of osteoclasts from peripheral blood mononuclear cells". *Biochemical and biophysical research communications* 357.4 (2007), pp. 1046–1052. ISSN: 0006-291X. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.04.042.
- [274] Mario M. Zaiss et al. "Treg cells suppress osteoclast formation: A new link between the immune system and bone". *Arthritis & Rheumatism* 56.12 (2007), pp. 4104–4112. ISSN: 00043591. DOI: 10.1002/art.23138.

# Danksagung

Ich möchte mich für die hervorragende Betreuung und die Übernahme des Referats bei Prof. Marco Durante und Prof. Gerhard Thiel bedanken.

Frau Prof. Claudia Fournier möchte ich für die freundliche Überlassung des hochinteressanten Themas danken. Ich danke ihr darüber hinaus für jede erdenkliche und hilfreiche Unterstützung und die vielen anregenden Diskussionen. Durch ihre Unterstützung und die gegebene Freiheit konnte ich mich als Wissenschaftlerin weiterentwickeln. Die zahlreichen kompetenten Ratschläge und Ideen trugen zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Desweiteren möchte ich mich bei Dr. Daniela Kraft bedanken, für ihre Hilfe, ihren Optimismus und die stets gute Laune. Sie gab ihr Fachwissen über Stammzellen und Strahlung mit großer Hingabe an mich weiter, ohne welches ich in dieser Arbeit nicht weiter gekommen wäre.

Der gesamten Abteilung der Biophysik möchte ich mich für alle Hilfestellungen und die optimale Umgebung während meiner Promotion bedanken. Auch Kollegen in der Arbeitsgruppe Late Effects verdienen an dieser Stelle einen großen Dank für das freundschaftlich entspannte Arbeitsklima. Insbesondere möchte ich mich für die große Hilfe bei Kateryna Shreder, Natalie Hoenig und Tanja Huhn bedanken, weil sie durch ihren Fleiß und Motivation mich in schwierigen Momenten unterstützten. Kateryna und Francesco Tommasino- danke für den grünen Tee und Tiramisu, sowie Einführung in die Weltliteratur.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, für ihre Fürsorge und Verständnis, Ratschläge und Unterstützung während meiner Promotion. Neben Prof. Claudia Fournier waren sie die treibende Kraft dieser Promotion.

Meinen Freundinnen danke ich für ihr Verständnis für meine längere Abwesenheit und eine echte, mittlerweile ein Jahrzehnt lange Freundschaft. Meinem Mann danke ich für die Liebe und die unentbehrliche Unterstützung.



# Curriculum Vitae

## Persönliche Daten

Dipl.- Ing. Aljona Groo

Kurt-Schumacher-Ring 18, 63329 Egelsbach

geboren am 11 Juni 1986 in Tschernaja Kurja (Russland)

ledig

E-mail: aljona.groo@yahoo.de

## Berufsausbildung

- |                  |   |
|------------------|---|
| Jun 11- Sep 14   | <b>Promotion, Fachbereich Biologie, TU Darmstadt</b><br>GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung<br>Forschungsfeld: Strahlenbiologie<br>Stipendiatin von HGS-Hire                                |
| Aug 06- April 11 | <b>Diplom-Ingenieur (FH), Hochschule Darmstadt</b><br>Studienfach: Biotechnologie<br>Thema der Diplomarbeit: Signaltransduktion der entzündungsrelevanten Zytokine in Lymphozyten und Endothelzellen. |

## Schulbildung

- |                 |   |
|-----------------|---|
| Sep 03 - Jun 06 | <b>Weibelfeldschule, Dreieich</b><br>Abitur                 |
| Jan 00 - Aug 03 | <b>Ernst-Reuter-Schule, Egelsbach</b><br>Realschulabschluss |
| Sep 93 - Dec 99 | <b>Grundschule und Gesamtschule, Russland</b>               |

## Publikationen

### Wissenschaftliche Berichte

A.GROO, D.KRAFT, M.HIRSCHMANN; ET AL *Response of bone marrow progenitor cells to ionizing irradiation*. GSI Scientific Report 2013.

GROO, A. ; KRAFT, D. ; MEYER, S. ; ET AL *Impact of ionizing radiation on differentiation and proliferation of human osteoblasts*. GSI Scientific Report 2012.

KRAFT, D. ; VOLCIC, M. ; GROO, A. ; ET AL *Processing of radiation-induced DNA double-strand breaks (DSBs) differs in human hematopoietic stem and progenitor cells versus mature lymphocytes*. GSI Scientific Report 2012.

LAU, P. ; HU, Y. ; HELLWEG, C. E. ; GROO, A; ET AL *AO-10-IBER-13: Osteoblast Like Cell Culture Model Systems In Response to Space relevant Qualities of Ionizing Radiation (OSIRIS 2.0)*. GSI Scientific Report 2012.

DETTMERING, T.; KLINGER, J.; GROO, A.; ET AL *Investigations on the transforming growth factor beta signalling pathway in human umbilical vein endothelial cells after radiation exposure*. GSI Scientific Report 2010.

### Konferenzbeiträge

A.GROO, N.HUHN, K.SHREDER, D.KRAFT, C.FOURNIER, M.DURANTE *Impact of ionizing radiation on differentiation and activity of bone-metabolism related cells*. Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung e.V. (GBS) 2014, Tübingen. Poster.

A.GROO, N.HUHN, K.SHREDER, D.KRAFT, C.FOURNIER, M.DURANTE *Impact of ionizing radiation on differentiation and activity of bone-metabolism related cells*. Annual Meeting of the European Radiation Research Society (ERR) 2014, Rhodos. Poster.

A.GROO, M.HIRSCHMANN, T.HUHN, K.SHREDER, D.KRAFT, C.FOURNIER, M.DURANTE *Impact of ionizing radiation on survival and differentiation of human bone marrow progenitor cells*. Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung e.V. (GBS) 2013, Darmstadt. Poster.

A.GROO, M.HIRSCHMANN, T.HUHN, K.SHREDER, D.KRAFT, C.FOURNIER, M.DURANTE *Impact of ionizing radiation on differentiation and proliferation of human bone marrow progenitor cells*. Annual Meeting of the European Radiation Research Society (ERR) 2013, Dublin. Poster.

A.GROO, D.KRAFT, C.FOURNIER, M.DURANTE *Impact of densely-ionising radiation on differentiation and proliferation of human osteoblasts and osteoclasts*. Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung e.V. (GBS) 2012, München. Poster.

## Stipendien

09/2011

**Reisestipendium für GBS**

Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung e. V.

# Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Aljona Groo  
Darmstadt, 26.09.2014